

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EXPLORACIÓN DE COMUNIDADES RIZOBACTERIANAS Y
AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS PGPR A
PARTIR DE LA RIZÓSFERA DE SUELOS CHILENOS
PROVENIENTES DEL DESIERTO DE ATACAMA, LA ESTEPA
PATAGÓNICA Y LA REGIÓN DE LA ARAUCANIA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

JOAQUIN IGNACIO RILLING TENORIO

TEMUCO – CHILE
2014

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EXPLORACION DE COMUNIDADES RIZOBACTERIANAS Y
AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS PGPR A
PARTIR DE LA RIZOSFERA DE SUELOS CHILENOS
PROVENIENTES DEL DESIERTO DE ATACAMA, LA ESTEPA
PATAGONICA Y LA REGION DE LA ARAUCANIA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.


JOAQUIN IGNACIO RILLING TENORIO

PROFESOR GUIA: DR. MILKO ALBERTO JORQUERA TAPIA

**TEMUCO – CHILE
2014**


“EXPLORACIÓN DE COMUNIDADES RIZOBACTERIANAS Y
AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS PGPR A
PARTIR DE LA RIZÓSFERA DE SUELOS CHILENOS PROVENIENTES
DEL DESIERTO DE ATACAMA, LA ESTEPA PATAGÓNICA Y LA
REGIÓN DE LA ARAUCANIA”

PROFESOR GUIA:



DR. MILKO ALBERTO JORQUERA TAPIA
ACADEMICO, DEPTO. DE CIENCIAS
QUIMICAS Y RECURSOS NATURALES
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESORES CONSEJEROS:



M.Sc PATRICIO JAVIER BARRA ESPINOZA
Dr (c). DOCTORADO EN CIENCIAS DE RECURSOS
NATURALES
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS: 6,3

*A mi madre, a Javiera, a la Tuna
Trovadores de la Universidad de La Frontera y
a José Manuel Ramírez (Petaco)*

INDICE

1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Fosforo, recurso mineral no renovable	3
2.1.1	Fosforo orgánico y su permanencia en los suelos	4
2.2	Cambio climático y sus efectos	5
2.2.1	Estrés por cambio climático	7
2.3	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como herramienta biotecnológica	8
2.3.1	Mecanismos de acción de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	8
2.3.1.1	Potencial promoción de crecimiento vegetal por de rizobacterias productoras de fitasas	9
2.3.1.1.1	Rizobacterias promotoras del crecimiento productoras de Beta-propeller fitasa	11
2.3.1.2	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa	12
2.4	Diversidad climática de Chile	14
2.4.1	Condiciones áridas: Desierto de Atacama y estepa Patagónica	14
2.4.1.1	Desierto de Atacama	14
2.4.1.2	Estepa Patagónica	15
2.4.2	Condiciones fértiles: Región de La Araucanía	16
3	JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	18
3.1	Hipótesis	18
3.2	Objetivo General	18
3.3	Objetivos específicos	18
4	METODOLOGIA	19
4.1	Muestreo de suelos	19
4.2	Determinación de unidades formadoras de colonias bacterianas	19
4.3	Comunidades microbianas y su composición en la rizósfera	20
4.4	Aislamiento de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	21
4.4.1	Aislamiento de rizobacterias degradadoras de fitato	21
4.4.2	Aislamiento de rizobacterias degradadoras de 1-aminociclopropano-1-carboxilato	21
4.4.3	Detección de genes de Beta-propeller fitasa y 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa	22
4.4.3.1	Detección de genes codificantes para Beta-propeller fitasa	22
4.4.3.2	Detección de genes codificantes para 1-aminociclopropano-1-carboxilato	23

	deaminasa	
4.5	Extracción de ADN genómico	23
4.5.1	Identificación de Rizobacterias promotoras del crecimiento putativas	24
4.6	Producción de ácido indol acético por Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	24
5	RESULTADOS	26
5.1	Recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas	26
5.2	Comunidades microbianas, su composición y estructura	26
5.3	Aislamiento de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	28
5.4	Identificación de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	30
5.4.1	Extracción de ADN genómico	30
5.4.2	Caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	30
5.5	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas productoras de ácido indol-3-acético	
6	DISCUSION	32
6.1	Recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas	32
6.2	Comunidades rizobacterianas, su composición y estructura	33
6.3	Aislamiento y caracterización de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	34
6.4	Producción de ácido indol-3-acético por Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas	35
7	CONCLUSIONES	36
8	LITERATURA CITADA	37
9	ANEXOS	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ácido fítico. pH < 5 (a) y a pH > 12 (b) (Turner <i>et al.</i> , 2002)	5
Figura 2	Mecanismo de acción de las fitasas bacterianas (Jorquera <i>et al.</i> , 2008)	11
Figura 3	Ruta metabólica ACC deaminasa (Glick <i>et al.</i> , 1998)	13
Figura 4	Bandas seleccionadas para secuenciación a partir de DGGE	27
Figura 5	(a): Análisis nMDS de las comunidades rizobacterianas; (b): Dendrograma originado a partir de DGGE	27
Figura 6	(a): Medio PSM con bacterias que utilizan fitato como fuente de P; (b): Medio DF/ACC con aislados que presentan actividad ACC deaminasa	29
Figura 7	(a) Electroforesis de producto PCR del gen codificante para BPP; (b): Electroforesis de producto PCR del gen <i>acdS</i> .	29

INDICE DE TABLAS Y ANEXOS

Tabla 1	Aislados positivos para los genes Beta-propeller fitasa (BPP) y <i>acdS</i>	28
Tabla 2	Producción de AIA en bacterias portadoras de los genes Beta-propeller fitasa (BPP) y <i>acdS</i>	31
Anexo 1	Taxonomía, y secuencias más cercanas reportadas en bases de datos según bandas DGGE.	50
Anexo 2	Taxonomía, y secuencias más cercanas reportadas en bases de datos de aislados PGPR putativos.	51

AGRADECIMIENTOS

Quisiera manifestar mis profundos agradecimientos a todos aquellos que contribuyeron de manera directa o indirecta al desarrollo de este trabajo de título. Entre todos los altos y bajos que se viven dentro del laboratorio, y los constantes contratiempos que existen en todo trabajo científico (querámoslo o no) siempre existen pequeñas muestras de apoyo y afecto que impulsan a que todo resulte de la manera esperada.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología en Recursos Naturales y en detalle al Dr. Milko Jorquera, por abrir las puertas de su laboratorio a un desconocido e inquieto muchacho (como el suele mencionar). A la Srta. Nitza Inostroza, por tener la paciencia para explicarme en detalle cómo hacer las cosas, aun cuando me tropecé varias veces con la misma piedra. Al sr. Patricio Barra, por codirigir este trabajo de título, aun cuando el tiempo no era algo que tuviera en exceso. A la Srta. Lorena Lagos, por regañar en aquellos momentos que no me encontraba dedicándole suficiente atención al trabajo.

Asimismo, también quisiera agradecer de forma personal a todos aquellos cercanos que no se hacían presentes día a día, sin embargo de forma subyacente impulsaron mi creciente ímpetu por desarrollar este trabajo. Es así, que me gustaría agradecer a la Tuna Trovadores de la Universidad de La Frontera, por encaminarme en los senderos del saber, el actuar y el crecer dentro de la Universidad, con una mirada diferente. Por su parte, quisiera hacer mención especial a los Sres. Ricardo Mardones, Emilio Domínguez, Jose Manuel Ramírez (Petaco), Antonio Matus, Felipe Urzúa, Cristian Venegas, Leonardo Solis, Gustavo Raddatz, Cristian Cárcamo, Felipe Larrañaga, Patricio Raddatz, Gonzalo Cea, Felipe González, Luis Opazo y Aldo Arriagada por lo vivido durante los últimos cinco años de carrera que culminan en este escrito.

Para finalizar, me gustaría dedicar unas palabras a María Angélica Tenorio y a Javiera Parada Carcamo. Sin el amor, la comprensión y la sabiduría que ambas poseen, quizás sería otra persona el día de hoy. Ahora que junto a Javiera continuamos estudiando, espero que toda la confianza y cariño que se ha depositado en nosotros rinda más y mejores frutos.

RESUMEN

En los distintos tipos de suelos, es posible encontrar bacterias simbiotas que promueven el crecimiento vegetal, las cuales pueden ser asociadas a todos los tipos de plantas, denominadas PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Este tipo de bacterias contribuye al desarrollo de las plantas mediante diversos mecanismos. Chile cuenta con una amplia variedad de ambientes, presentándose de norte a sur, entre los que encontramos: Desérticos, mediterráneos, templado-lluviosos, oceánicos y semi-áridos. Sin embargo, aquellos ambientes deficientes en términos agronómicos no son estudiados en profundidad debido al poco interés productivo que estos presentan a nivel de suelo. Asimismo ambientes que si son productivos agronómicamente se están viendo afectados por la disminución en el rendimiento de los suelos, a causa del uso intensivo de fertilizantes químicos, principalmente en base a P y N. Por otra parte, el cambio climático ejerce su efecto año a año de manera paulatina, incrementando cada vez más el estrés abiótico en plantas a través de sequía, aumentos de temperatura, salinidad, erosión y otros.

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la composición y estructura de las comunidades rizobacterianas dos suelos con carácter árido (Desierto de Atacama y estepa Patagónica), en contraste con suelos fértiles de Chile (Región de La Araucanía), y aislar desde estos bacterias con características PGPR productoras de las enzimas Beta-propeller fitasa y 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa. Ambos objetivos fueron llevados a cabo mediante el uso de técnicas microbiológicas (uso de medios de cultivo selectivos) y de biología molecular (PCR, DGGE y secuenciación). A partir de los experimentos realizados, el análisis DGGE reveló la composición de las comunidades rizobacterianas correspondientes a cada rizósfera muestreada, encontrándose la presencia de los órdenes *Enterobacteriales*, *Actinomycetales* y *Rhizobiales* en todos los ambientes. Es así como también mediante nMDS se encontraron diferencias en la estructura de las comunidades rizobacterianas de los tres ambientes estudiados.

Respecto a la presencia de PGPR, 25 aislados bacterianos provenientes desde todos los ambientes explorados reportaron la presencia de uno o ambos genes de interés para este estudio. Todos los aislados obtenidos fueron capaces de producir la fitohormona ácido indol-3-acético bajo condiciones de laboratorio.

SUMMARY

In different type of soils it is possible to find symbiotic bacteria promoting plant growth, which could be in association with all type of species denominated PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). This kind of bacteria contributes to plant development in several ways. Chile has a wide variety of environments from north to south, such as: desertic, mediterranean, temperate, temperate-rainy, oceanic and semi-arids. However, environments with unfavorable agronomic properties are not deeply explored, because of the low productivity interest that those presents at soil level. In this terms, productive environments are being affected by a decrease in soil yield, as a direct consequence of the intensive use and abuse of chemical fertilizers (mainly based in P and N) in order to enhance productivity. On the other hand, the climatic changes are being noticed with mayor intensity year after year, increasing the abiotic stress in plants of diverse environments like drought, heat shocks, and increments in soil salinity, soil erosion, among others.

The objectives of this work were study the composition and structure of rhizobacterial communities and their structure from two Chilean soil with arid conditions (Atacama Desert, and Patagonian Steppe), contrast them with fertile soils of Chile (Región de La Araucanía) and from them isolate bacteria with PGPR traits as production of Beta-propeller phytase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Both objectives were performed with microbiologic techniques (use of specific culture mediums) and through molecular biology procedures (such as PCR, DGGE and Sequencing).

As results of all the experiments performed, through DGGE we described the composition of the rhizobacterial communities from all the sampled environments, reporting the presence of *Enterobacteriales*, *Actinomycetales* y *Rhizobiales* orders in all sampled environments. Also, with an nMDS analysis differences in the structure of the studies communities were described.

On the other hand, 25 PGPR isolates were obtained from all three environments sampled, which contains one or both genes of interest for this study. All isolates obtained were capable of produce the phytohormone indole-3-acetic acid production, under laboratory conditions.

1.- INTRODUCCION

El desarrollo de la agricultura moderna exige en gran medida la búsqueda de mecanismos que permitan aumentar el rendimiento de los distintos cultivares. En este tópico, existe una gran dependencia por el uso de fertilizantes químicos, con un particular énfasis en aquellos basados en nutrientes como el N y P. El P, macronutriente esencial para los organismos vivos se aplica al suelo en forma de fosfatos, los cuales son obtenidos mediante la minería de la roca fosfórica. Mediante minería, el P se obtiene desde estas rocas, las cuales actualmente son un recurso no renovable. En estos términos, la minería de roca fosfórica predice que esta se agotara de aquí a los próximos 100 años alcanzando un punto máximo de extracción para el año 2030 (Cordell *et al.*, 2009; Suh y Yee, 2011). El relación al consumo de fertilizantes basados en P, su consumo ha aumentado exponencialmente desde principios del siglo pasado, comenzando con un consumo promedio de 5 Mt (millones de toneladas) a 30 Mt de P aplicado reportado en las últimas décadas, donde estimaciones realizadas por Steen (1998), predicen que para el año 2050 ese consumo podría llegar hasta los 60 – 70 Mt.

Sumado a esto, diversos estudios predicen que el cambio climático regente tendrá efectos negativos sobre la productividad de la agronomía (ej.: cultivares de trigo). Estos efectos podrían categorizarse como directos o indirectos, de acuerdo a su naturaleza, y entre sus causas podemos encontrar: Olas de calor, aumento en la salinidad de los suelos, sequías prolongadas e inundaciones (Atkinson y Urwin, 2012; Grover *et al.*, 2010). Es así, como actualmente muchos cultivos alrededor del mundo se están viendo afectados por un fuerte estrés hídrico, debido a la reducción sustantiva de las precipitaciones, que ha ido de la mano con un aumento de la temperatura del aire. Bajo este escenario, y tomando en cuenta la creciente demanda por alimentos proporcional al aumento de la población humana, es necesario desarrollar nuevas estrategias que permitan proteger la industria agronómica, y subsecuentemente la producción alimentaria.

Por otro lado, en la rizósfera de todos los tipos de plantas, existen comunidades bacterianas que se relacionan con las plantas de diversas maneras. Dentro de estas comunidades es posible encontrar relaciones entre organismos tales como simbiosis, mutualismo y parasitismo. Estas comunidades regularmente se diferencian unas de otras por el suelo en el cual de desarrollen, por lo que en su

composición es posible encontrar bacterias férreamente adaptadas a un tipo de rizósfera en específico.

Es así, que en esta constante interacción, las plantas entran en contacto con una amplia variedad de cepas bacterianas que poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal (PGPR), confiriéndoles además la capacidad de tolerar algunas enfermedades (Berrendeen *et al.*, 2012). En este sentido, distintos mecanismos se han descrito mediante los cuales las bacterias ejercen su efecto benéfico sobre las plantas a través de la raíz de estas. Entre estos mecanismos, uno de los estudiados en abundancia es la solubilización de P (Bhattacharyya y Jha, 2012). Al aplicar P a los suelos mediante fertilización química, una alta cantidad del fosfato aplicado es acomplejado en forma de P orgánico (P_o), y una de sus formas más abundante en los suelos es denominada fitato. Los fitatos, son sales del ácido fítico altamente estables y difíciles de hidrolizar. (Turner *et al.*, 2002), desde donde mediante solubilización es posible obtener P inorgánico (P_i) disponible para las plantas (Mullen, 2005; Turner *et al.*, 2002). Esto, es posible gracias a enzimas denominadas fitasas, donde la tasa de solubilización más elevada es atribuida al grupo de las Beta-propeller fitasas.

Otro efecto promotor del crecimiento de gran interés agronómico consiste en un aumento a la tolerancia que las plantas presentan frente a diversos tipos de estrés abiótico. Bajo condiciones de estrés, las plantas presentan cambios metabólicos, como el aumento de las concentraciones intracelulares de etileno, fitohormona que de producirse prolongadamente tiene efectos deletéreos para la planta, por lo que finalmente esta termina muriendo (Yang y Hoffman, 1984). En la rizósfera, existen bacterias que mediante la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa son capaces hidrolizar el precursor inmediato del etileno, el ACC, ayudando indirectamente a la planta a tolerar los efectos adversos que el estrés abiótico pudiese generar sobre esta, promoviendo su crecimiento de manera indirecta (Bhattacharyya y Jha, 2012; Glick *et al.*, 2007; Martínez-Viveros, 2010).

Actualmente, Chile es reconocido por presentar una amplia diversidad climática, que por efecto directo ha generado la formación de diversos ecosistemas de norte a sur. En estos ecosistemas, es posible encontrar una gran diversidad de especies vegetales, que pueden ser de vida silvestre, así como de interés agronómico. Sin embargo, a pesar de la amplia diversidad presente, pocos estudios

son llevados a cabo en ambientes con condiciones desfavorables para la agronomía, de acuerdo al poco interés que estos sustentan. A pesar de lo mencionado, un factor rara vez considerado es el hecho de que a nivel de rizósfera de plantas que se encuentran en ambientes con condiciones desfavorables, existen bacterias que están fuertemente adaptadas para entregar a la planta los nutrientes que esta necesite, independiente de las condiciones del suelo donde se encuentran. Es así que mediante este estudio se pretende comprender la estructura de estas comunidades presentes en la rizósfera, su composición y además explorar la presencia de PGPR con la capacidad de solubilizar fitato e hidrolizar ACC descritas anteriormente.

2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Fosforo, recurso mineral no renovable

El fosforo (P) es un elemento esencial en todos los organismos vivos, formando parte de moléculas tan importantes como el DNA o el ATP, encargadas de almacenar la información genética y de entregar energía química a las células, respectivamente. (Suh y Yee, 2011). Asimismo, el P cumple un rol fundamental en lo que es el desarrollo de las especies vegetales, y a diferencia de elementos como el nitrógeno (N), no existe una fuente atmosférica desde donde las plantas puedan captarlo. (Ezawa *et al.*, 2002; Govindasamy *et al.*, 2011). De manera natural, el fosforo se encuentra sobre la corteza terrestre en forma de roca fosfato, donde por procesos de lixiviación y desgaste es movilizado al suelo. Dado que la liberación de P requiere bastante tiempo en forma natural, es que desde principios de siglo (con el desarrollo de la agronomía intensiva) se realiza fertilización mediante la adición de fosforo inorgánico (P_i) a los distintos cultivos. (Steen, 1998). El P_i se obtiene principalmente mediante la minería de la roca fosfórica y suplementado con N, K y ácido sulfúrico (como fuente de S) (Cordell *et al.*, 2011).

Según datos recopilados por Steen, (1998), con el aumento sostenido de la población mundial, es que para suplir las necesidades alimentarias el consumo de P_i ha incrementado exponencialmente desde 1930, donde hasta el año 1995 se consumían 30 millones de toneladas (Mt), estimando que para el año 2050 la tendencia se mantenga, pronosticando entre 60-70 Mt. La tendencia al consumo exacerbado de P_i , hace prever que las reservas naturales de roca fosfórica se agotarían durante los próximos 50 a 100 años (Steen, 1998), por lo que es necesario buscar alternativas sustentables a la obtención de este mineral (Ashley *et al.*, 2011; Cordell *et al.*, 2011; Steen, 1998; Suh y Yee, 2011). Haciendo uso de nuevas tecnologías, se pretende obtener rendimientos agronómicos comparables a los que se obtienen en la actualidad (Suh y Yee, 2011), ayudando también a combatir problemas generados por la aplicación de P_i al suelo como la eutrofización de masas de agua por lixiviación de P orgánico (P_o) remanente de la fertilización (McDowell y Sharpley, 1995; Sharpley *et al.*, 2008; Vadas *et al.*, 2005).

A pesar del uso intensivo de P_i , Shang *et al* (1992), menciona que en suelos fertilizados, un 90% del P_i añadido es adsorbido rápidamente a las partículas del suelo, o también precipitado por cationes. De acuerdo a estos datos, se ha descrito que en países como EE.UU. solo 15% del P_i aplicado como fertilizante es aprovechado, del 85% restante, existe un 66% que es desaprovechado por la agricultura, siendo devuelto al suelo en forma de P_o (42% atribuible a desechos de ganado, 24% atribuible a desechos de cultivos) (Suh y Yee, 2011).

2.1.1 Fosforo orgánico y su permanencia en los suelos

El P_o , puede llegar a constituir entre un 30 - 50% del P total en suelos que reciben fertilización (Turner *et al.*, 2003). Según Anderson, 1980, los inositol-fosfatos (IP) son las formas predominantes de P_o en el suelo. Estas moléculas insolubles se componen de un anillo inositol y de 1 a 6 grupos fosfato (Turner *et al.*, 2002), donde a mayor cantidad de grupos fosfato en la molécula, más persistente es en el suelo, distribuyéndose de la siguiente manera: 82:12:4:1% respectivamente para $IP_6:IP_5:IP_4:IP_3$ (Anderson, 1980). IP_6 (*myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisdihidrogenofosfato) recibe el nombre de ácido fítico (Fig. 1), y en combinación con otras sales forman el grupo de los fitatos. Los fitatos, son sintetizados para acumular inositol y fosfatos en semillas y grano representando entre un 60 - 90% del P total contenido en las plantas (Reddy *et al.*, 1982), siendo este el mayor reservorio a nivel vegetal (Lott *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2002).

Algunos autores han mencionado que existen plantas con la capacidad de utilizar fitato como fuente de P de manera natural (Helal y Sauerbeck, 1991; Tarafdar y Claassen, 1988), sin embargo estudios más recientes manifiestan que su capacidad de solubilizar el fitato es muy baja (Idriss *et al.*, 2002).

En el suelo, los fitatos se encuentran adsorbidos a partículas coloides (ej.: arcillas), o precipitados como sales insolubles de Al, Fe, y Zn en suelos ácidos, Mg, Ca en suelos alcalinos (Shang *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 2002) y para solubilizarlos es necesaria la presencia de enzimas hidrolíticas denominadas *myo*-inositol-hexakisfosfato-fosfohidrolasas, o comúnmente fitasas, presentes principalmente en bacterias y hongos.

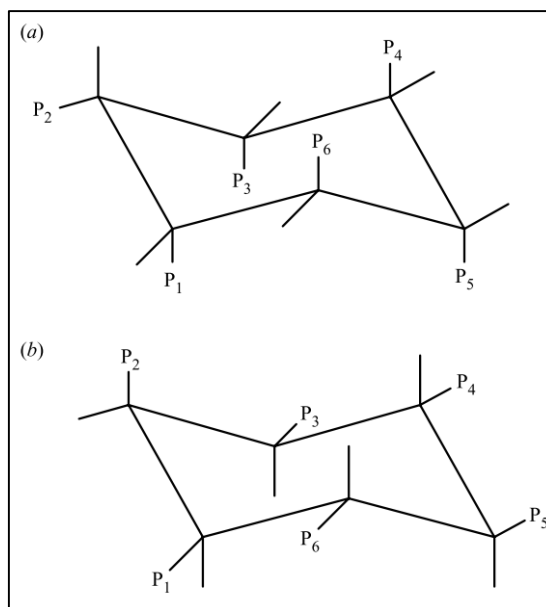


Figura 1. Ácido fítico. pH < 5 (a); pH > 12 (b) (Turner *et al.*, 2002)

Actualmente, aquellas bacterias que solubilizan P son consideradas dentro de un grupo particular de bacterias que promueven el crecimiento vegetal, denominado PGPR (del inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Bhattacharyya y Jha, 2012).

2.2 Cambio climático y sus efectos

El cambio climático regente que ha reflejado sus efectos desde principios de la revolución industrial (ej.: aumento de temperaturas y disminución de precipitaciones en un gran número de ambientes) (Araújo y Rahbek, 2006) repercute en todas las formas de vida del planeta, generando cambios en la estructura de ecosistemas marinos (Harley *et al.*, 2006; Hays *et al.*, 2005), terrestres (Craine *et al.*, 2010; Garrett *et al.*, 2006; Thuiller, 2007) e incluso repercutiendo en los patrones migratorios de las aves (Crick, 2004). Asimismo, también se han reportado efectos en cómo la población humana y sus actividades se adaptan a esta situación (DeMenocal, 2001; Hansen *et al.*, 2012; Hulme *et al.*, 2001; McLeman y Smit, 2006; Rosenzweig y Parry, 1994).

Entre las actividades humanas más afectadas por el cambio climático se encuentra la agricultura (Rosenberg 1992; Lal 2004; Richter y Semenov 2005; Howden *et al.* 2007; Tubiello *et al.* 2007). Es en este tópico, donde diversos autores describen que la combinación de cambio climático y la creciente población humana son un punto crítico a tratar en un corto plazo, de acuerdo a la potente demanda alimentaria que azota al planeta (Cordell *et al.*, 2009; Lobell *et al.*, 2008; Rosenzweig y Parry, 1994).

Para una agricultura sustentable, es necesario tener condiciones a nivel de suelo (temperatura, humedad, pH, salinidad) que sean optimas, por lo que al cambiar progresivamente el clima, cambia el ambiente, y de la misma manera puede aumentar o disminuir el rendimiento de los suelos (Olesen y Bindi, 2002). Es señalado además que los cultivares pueden adaptarse a estas nuevas condiciones. Olesen y Bindi., (2002), reportaron un aumento de eficiencia de agua de hasta un 50% en plantas de trigo, al doblar las concentraciones de CO₂ atmosférico.

Sin embargo, autores describen que el cambio climático tiene un efecto principalmente negativo sobre la agricultura y la producción mundial de cultivares (ej.: Trigo) debido a periodos de sequía, abundantes precipitaciones, olas de calor y daño por heladas (Grover *et al.*, 2010; Rosenberg, 1992). En este contexto, con el aumento progresivo de la temperatura y la disminución de precipitaciones, la disminución de la humedad a nivel de suelo aumenta, y la sequía es una de las problemáticas más importantes de tratar en el corto plazo (Rosenberg, 1992). De hacerse sostenido el cambio climático para los próximos años, se prevén disminuciones en la capacidad de campo de los suelos, erosión de estos y cambios en el sistema de evapotranspiración de las plantas (Rosenberg, 1992), como también cambios en la distribución natural de estas (Kelly y Goulden, 2008) y desaparición de variedades no tolerantes al estrés (Eitzinger *et al.*, 2003). Según otros autores será necesario aumentar constantemente los caudales de regadío, junto con el desarrollo de tecnologías para aumentar la retención de humedad en zonas que sean críticas (Howden *et al.*, 2007), ya que se estima que para el año 2070 se requerirá un 5 - 8% de aumento en la capacidad de regadío en comparación con la actualidad, cifra que se eleva a un 20% para el año 2080 (Tubiello *et al.*, 2007).

Es así como otras publicaciones señalan que para suelos cultivables con condiciones hídricas parcialmente deficientes el rendimiento podría disminuir en un 50% dentro de los próximos 30 años, caso que entre los próximos 50 a 100 años ocurriría también en suelos donde las condiciones hídricas son favorables (Richter y Semenov, 2005).

2.2.1 Estrés por cambio climático

Cuando las condiciones climáticas cambian sostenidamente en el tiempo de la manera descrita, las plantas suelen adaptarse. Es sabido que de manera natural las plantas siempre están expuestas a condiciones desfavorables, como puede ser excesiva intensidad lumínica, inundaciones, sequía, metales pesados, contaminación por compuestos orgánicos de alto peso molecular, radiación UV, daño mecánico, alta salinidad y fitopatogenos (Abeles *et al.*, 1992; Glick *et al.*, 2007). Dado que las plantas no pueden moverse de un ambiente a otro a voluntad, al estar sometidas a estrés estas modifican su metabolismo hasta que las condiciones ambientales sean ideales nuevamente, o en su defecto, hasta que el estrés sea tolerable (Kim *et al.*, 2012). Estas modificaciones inhiben el crecimiento vegetal, debido a que la planta a modo de protegerse produce fitohormonas (principalmente auxinas y etileno) que le permitan sobreponerse a los efectos deletéreos que el estrés genera (Glick y Penrose, 2004; Grichko y Glick, 2001; Kim *et al.*, 2012; Mayak *et al.*, 2004), entre estos compuestos, uno de los más estudiados es el etileno (Argueso *et al.*, 2007; Brown, 1972; Czarny *et al.*, 2006; Glick, 2012; Glick *et al.*, 1995, 1998, 2007; Grichko y Glick, 2001; Kim *et al.*, 2012; Muday *et al.*, 2012; Rashid *et al.*, 2012).

El etileno es una de las moléculas con actividad orgánica más simples, funcionando como regulador directo del crecimiento vegetal en concentraciones muy bajas ($0,05 \mu\text{L L}^{-1}$) (Abeles *et al.*, 1992). Entre sus roles, Abeles, 1992, señala que el etileno en plantas vasculares controla respuestas como la formación de tallo y raíz, maduración de frutos, germinación de semillas, desarrollo de yemas laterales, abscisión de hojas e incluso la floración. Sin embargo, también señala que bajo estrés, la exposición prolongada al etileno gatilla un fenómeno denominado “estrés del etileno”, causado por una biosíntesis acelerada del etileno, que puede desencadenar la muerte de la planta (Morgan y Drew, 1997).

2.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como herramienta biotecnológica

Dentro de la rizósfera es posible encontrar una amplia diversidad de organismos (principalmente microorganismos, como hongos y bacterias). Según Beattie (2006), un porcentaje mayor de las rizobacterias son comensales y no producen efecto alguno en el huésped, por lo que su interacción se categoriza como neutra. Aquellas rizobacterias que por otra parte son patógenas o generan daños al huésped (ej.: mediante liberación de ácido cianhídrico) (Bhattacharyya y Jha, 2012) se describe que presentan interacción negativa (Whipps, 2001). Asimismo, en asociación a todos los tipos de plantas, existen bacterias que presentan interacción positiva, las cuales promueven el crecimiento vegetal, denominadas PGPR (Berendsen *et al.*, 2012; Kloepper *et al.*, 1980). Estas bacterias, que pueden ser simbioses obligadas como de vida libre, se encuentran en casi todos los ambientes y debido a sus características, ofrecen una alternativa para el reemplazo de fertilizantes químicos, pesticidas y agroquímicos (Bhattacharyya y Jha, 2012). Según la parte de la planta donde actúen se las clasifica como ePGPR (extracelulares) e iPGPR (intracelulares) (Martínez-Viveros, 2010). El grupo iPGPR concentra aquellas PGPR simbioses que se encuentran generalmente dentro de nódulos especializados, y aquellas actinobacterias del género *Frankia* (Bhattacharyya y Jha, 2012). Algunos géneros iPGPR son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Wang y Dai, 2010; Wang y Martínez-Romero, 2000). En contraste, el grupo ePGPR agrupa aquellos géneros que se encuentran de manera libre en la rizósfera, rizoplano y espacios intercelulares del cortex radical. Los géneros característicos de este grupo son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, y *Serratia* (Gray y Smith, 2005). Entre las ePGPR, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus subtilis* son descritos como organismos modelo para estudiar características PGPR, de acuerdo a su capacidad para colonizar y persistir en los suelos, en base a la capacidad para formar endosporas que ambas especies poseen (Govindasamy *et al.*, 2011).

2.3.1 Mecanismos de acción de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Generalmente, las PGPR son Gram (-), presentan forma de bacilo (Bhattacharyya y Jha 2012), y entre las características que promueven el crecimiento vegetal encontramos:

Solubilización y mineralización de P, producción de sideróforos, fijación biológica de N, producción de antibióticos, producción de ácidos orgánicos y compuestos volátiles, inducción de resistencia sistémica, producción de fitohormonas (ej.: Acido indol-3-acético, AIA) y otras (Bashan y Luz, 2010; Gupta *et al.*, 2000; Martínez-Viveros, 2010). Las PGPR pueden presentar una o más de estas características. Según Glick (1995), las PGPR pueden actuar de manera directa o indirecta, de acuerdo a las características previamente mencionadas y por lo mismo diversos autores las clasifican como: Biofertilizantes (Somers *et al.*, 2004; Vessey, 2003), fitoestimuladoras (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004), biopesticidas (Somers *et al.*, 2004; Vessey, 2003), rizoremediadoras (Burd *et al.*, 1998; Glick, 2003, 2010; Lugtenberg y Kamilova, 2009) y reductoras de estrés (Glick y Penrose, 2004; Kim *et al.*, 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009; McDonnell *et al.*, 2009).

En relación a los efectos que estas generan, se ha descrito que diversos aislados PGPR incrementan el tamaño de las plantas en función al largo del vástago, raíz y aumento de peso seco en cultivos de papa, tomate, maíz y trigo (Bhattacharyya y Jha, 2012) lo que las hace potenciales candidatas para reemplazar el uso de productos agroquímicos, sin embargo, (Bashan y Holguin, 1998; Lucy *et al.*, 2004) señalan que la efectividad de las PGPR puede ser exclusiva de alguna especie, genotipo o cultivar. Es por ello que diversos autores señalan que aún falta comprender en profundidad los mecanismos mediante los cuales actúan las PGPR, dado que en la actualidad cada característica de interés se estudia por separado (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

2.3.1.1 Potencial promoción de crecimiento vegetal por de rizobacterias productoras de fitasas

Las fitasas, catalizan la hidrólisis del ácido fítico en una molécula de inositol (o sus precursores inmediatos), metales y ortofosfatos (PO_4) (Yao *et al.*, 2012). Entre los tipos de fitasas descritos se encuentran (en inglés): Beta-propeller fitasas (BPP), Fosfatasas ácidas-histidinas (HAP) y Fosfatasas púrpura-ácidas (PAP) (Jorquera *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2010; Tye *et al.*, 2002). A estas fitasas, se suma una enzima denominada Fosfatasa alcalina (ALP) (presente una mayor diversidad de organismos) que de igual manera es capaz de liberar ortofosfatos desde diversos tipos de moléculas (Thioulouse *et al.*, 2012). Según Jorquera *et al.* (2008b), las fitasas se

encuentras distribuidas en plantas, animales y microorganismos. En este contexto, estudios reportan que las fitasas secretadas por microorganismos tienen mayor actividad en comparación a organismos superiores (Pandey *et al.*, 2001; Vohra y Satyanarayana, 2003), destacándose aquellas producidas por bacterias, sobre todos los reinos (Rodríguez *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999), esto debido a su alta resistencia a proteólisis, mejor eficiencia catalítica y alta especificidad. Ejemplo de ello es la aplicación de fitasas bacterianas como suplemento alimenticio en la dieta de animales de granja mono-gástricos como cerdos y aves (Jorquera *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2012).

El mecanismo por el cual actúan las fitasas bacterianas (Fig. 2) parte con la secreción de las enzimas al suelo, formando complejos con las partículas del suelo de la misma manera que los IP, y también hidrolizando moléculas de fitato ya presentes en este, liberando P_i y previniendo la acumulación de P_o (Mullen, 2005). En el caso de estar en presencia de sales de fitato conjugadas con Al y Fe, las fitasas no son capaces de hidrolizar las moléculas por si solas (Turner *et al.*, 2002). Sin embargo cuando hay deficiencias de P_i , las plantas liberan ácidos orgánicos por la raíz (malato, citrato, oxalato, y otros) que mineralizan el P_i , para facilitar su solubilización. Ha sido demostrado que la liberación de citrato contribuye a la mineralización de sales de fitato conjugadas con Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} (Tang *et al.*, 2006). Esto se sustenta en estudios realizados por Earl *et al.*, 1979 y Traina *et al.*, 1986 donde señalan que las concentraciones de P_i en el suelo aumentan entre 10 a 1000 veces en presencia de ácidos orgánicos, los cuales desorben el P_i de constituyentes del suelo como $Al(OH)_3$ y $Fe(OH)_3$.

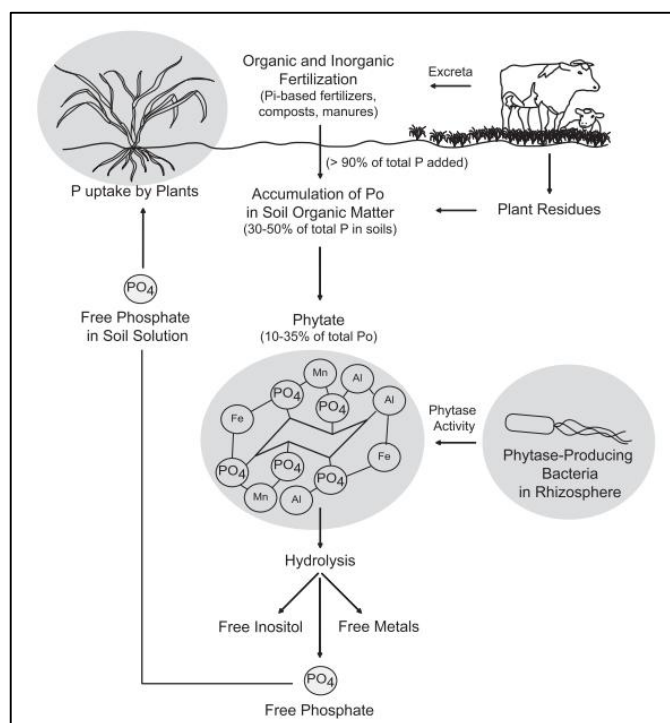


Figura 2. Mecanismo de acción de las fitasas bacterianas (Jorquera *et al.*, 2008)

2.3.1.1.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento productoras de Beta-propeller fitasa

Dadas las precarias condiciones para degradar el fitato por parte de la plantas, las fitasas bacterianas aparentan ser la alternativa correcta para recuperar el P_o presente en los suelos (Jorquera *et al.*, 2008, 2012, 2013; Menezes-Blackburn, 2013; Vats y Banerjee, 2004). De entre todos los tipos de fitasas, el más eficiente hasta el momento reporta ser BPP (descrito inicialmente en *Bacillus*), de acuerdo a su actividad catalítica, especificidad, termoestabilidad y capacidad de trabajar en un amplio rango de pH (Choi *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2008; Jorquera *et al.*, 2011; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2011; Powar y Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Tye *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2011). BPP han sido descritas en otros géneros bacterianos como *Klebsiella* (Huang *et al.*, 2009), *Pseudomonas* (Jorquera *et al.*, 2012), *Paenibacillus* (Jorquera *et al.*, 2011), *Shewanella* (Cheng y Lim, 2006; Huang *et al.*, 2009), *Pedobacter* (Huang *et al.*, 2009).

Por otro lado, estudios demuestran que la inoculación de plantas con PGPR que presentan la enzima BPP promueven el crecimiento vegetal (Idriss *et al.*, 2002). Asimismo, experimentos realizados

en plantas de *Nicotiana tabacum* donde se insertó el gen codificante para BPP (Lung *et al.*, 2005) revelaron una promoción del crecimiento de la raíz, en agar sólido suplementado con fitato como única fuente de P.

2.3.1.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa

Al igual que en la solubilización de P, existen rizobacterias que tienen la capacidad de regular los niveles de etileno dentro y fuera de las plantas (Chernin y Glick, 2012; Glick, 2012; Glick *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2003; Madhaiyan *et al.*, 2006; Mayak *et al.*, 2004; Shah y Li, 1998; Shaharoon *et al.*, 2006). Esto se basa en la hidrólisis del precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) mediante la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC deaminasa) en α -ketobutarato y amonio (NH_4) (Glick *et al.*, 1998). Esta hidrólisis, ayuda a las plantas a tolerar los efectos adversos que el estrés ambiental genera, así como también previniendo el estrés por etileno. Esta enzima (codificada por el gen *acdS*) ha sido reportada en bacterias en los géneros *Enterobacter* (Jha *et al.*, 2012), *Pseudomonas* (Jorquera *et al.*, 2012; Kamala-Kannan *et al.*, 2010), *Rhizobium* (Duan *et al.*, 2009), *Burkholderia* (Weisskopf *et al.*, 2011), *Azospirillum*, *Agrobacterium* (Blaha *et al.*, 2006), así como también en algunos hongos (Jia *et al.*, 1999). La presencia del gen *acdS* en múltiples géneros es explicada por Hontzeas *et al.* 2005, donde señalan que existe evidencia de que este gen es transferido horizontalmente.

El mecanismo mediante el cual las bacterias con actividad ACC deaminasa estimulan de manera indirecta el crecimiento vegetal fue descrito por Glick *et al.*, (1998) (Fig. 2), y se sustenta en la producción de AIA (en presencia de triptófano u otros exudados radicales) por PGPR que se encuentren en la raíz o semilla de una planta en desarrollo. La producción de AIA puede estimular elongación celular, proliferación celular, o inducir la actividad de ACC sin tasa de metabolizar S-adenosilmetionina en ACC. Parte del ACC producido es exudado radicalmente y secuestrado por bacterias con actividad ACC deaminasa. Al disminuir la concentración de ACC en la rizósfera, la planta libera más ACC al medio, nutriendo a las bacterias de C y N a medida que es hidrolizado. Esto permite disminuir la inhibición en el crecimiento radical de las plantas, producida por el etileno.

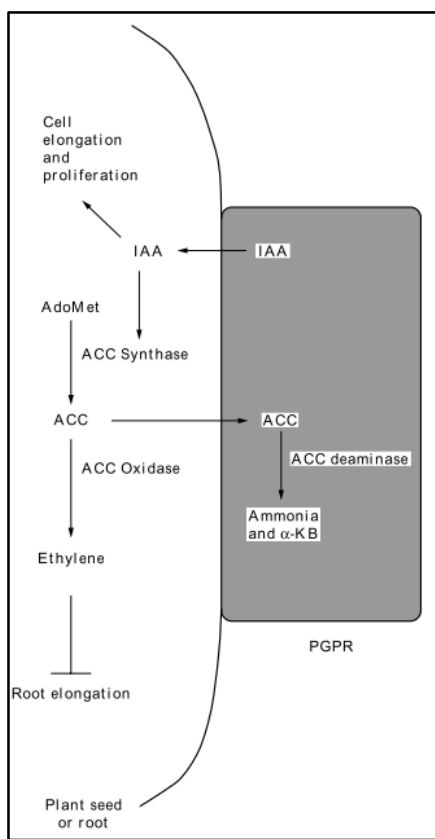


Figura 3. Ruta metabólica de ACC deaminasa (Glick *et al.*, 1998).

En este contexto Glick *et al.*, (1998); Li *et al.*, (2000), mediante mutagenesis al gen *acdS* en *P. putida* Gr12-2 y *Enterobacter cloacae* UW4 respectivamente, demostraron que las cepas mutadas no regularon los niveles de etileno a nivel de raíz en plantas de canola, donde solo las cepas 'wild type' estimularon el crecimiento radical.

Asimismo, estudios recientes reportan que la inoculación con PGPR que presenten actividad ACC deaminasa promueven el crecimiento vegetal en plantas de maíz (*Zea mays* L.) (Kausar y Shahzad, 2006; Shahzad *et al.*, 2013), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Onofre-Lemus *et al.*, 2009), y ají (*Capsicum annuum* L.) (Siddikee *et al.*, 2011), como además pueden contribuir en procesos de fitorremediación (Arshad *et al.*, 2007; Glick, 2003, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

2.4 Diversidad climática de Chile

Chile tiene 4200 kms. de extensión, con un ancho variable entre 90 a 460 kms y se caracteriza por presentar grandes contrastes en términos de clima, geología, vegetación, suelo y recursos hídricos (Roberts y Diaz-Vial, 1957), donde el clima y los recursos hídricos controlan en gran medida las características de los suelos y la vegetación, así como su calidad, productividad y usos.

Di Castri y Hajek (1976) realizaron una clasificación bioclimatológica de Chile, describiendo que de norte a sur Chile presenta condiciones absolutamente desérticas (Norte grande, XV, I y II Regiones), evidenciándose una disminución en las temperaturas conforme se avanza hacia el sur (Norte chico, III y IV Regiones), donde el clima tiene una tendencia mediterránea. Desde la zona centro (Región metropolitana) hasta la VIII región, el clima es netamente mediterráneo. Sin embargo, desde la IX Región a la X Región se acentúan influencias oceánicas en el clima, lo que lo caracteriza como templado lluvioso. Entre la X y XII Regiones el clima es completamente oceánico, con tendencias semi-áridas en las estepas Patagónicas.

Es así, que de acuerdo a los distintos climas de Chile, es posible encontrar una amplia diversidad a nivel de ecosistemas.

2.4.1 Condiciones áridas: Desierto de Atacama y estepa Patagónica

2.4.1.1 Desierto de Atacama

El Desierto de Atacama se encuentra ubicado en el extremo norte de Chile y está descrito como el desierto más árido del mundo (Clarke, 2006; McKay *et al.*, 2003). Se ha descrito que las condiciones de aridez han sido sostenidas en el Desierto de Atacama durante los últimos 150 millones de años (Hartley y Chong, 2005), describiendo al Desierto de Atacama con la sigla **Ea23** en la escala de Meigs (**E**=Extremo árido; **a**=sin periodo definido de precipitaciones (pp.); **2**=temperatura media entre 10° y 20° durante en meses fríos; y **3**=temperatura media entre 20° y 30° en meses más cálidos). En este contexto, se ha descrito que si bien la temperatura del aire no es extremadamente alta, en zonas extremas (como el Valle de la Muerte) puede ascender hasta los

50°C durante varios días (McKay *et al.*, 2003), asimismo, Clarke (2006), señala que las pp. aumentan de Norte a Sur, aunque son extremadamente débiles (0,5 – 0,6 mm de pp. anuales).

Los suelos del Desierto de Atacama a pesar de las condiciones adversas, pueden presentar materia orgánica. Navarro-González *et al.*, (2003), mediante cromatografía gaseosa (pyr-GC-MS) encontraron materia orgánica en distintos lugares del Desierto de Atacama, obteniendo resultados en partes por billón (ppb.) para la zona más árida. Conforme aumentaba la aridez, aumento también la concentración de ácido fórmico y benceno, resultados inversamente proporcionales al número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g) reportado. Asimismo, el pH de los suelos descrito por Navarro-González *et al.*, (2003) no afecta el desarrollo de bacterias del suelo, puesto que toma valores entre 5,5 - 8,6.

En el Desierto de Atacama diversos autores han reportado la presencia de los *phylum Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*, donde en *Actinobacteria* se describen principalmente *Streptomyces* y *Frankia* (Connon *et al.*, 2007; Okoro *et al.*, 2009; Santhanam *et al.*, 2012). En *Proteobacteria* es posible encontrar representantes de los géneros *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Sphingomonas*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Burkholderia* (Lester *et al.*, 2007). Asimismo, en *Firmicutes* se han reportado representantes cosmopolitas del *phylum* como *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Lester *et al.*, 2007).

Las bacterias que habitan los suelos del Desierto de Atacama se caracterizan por ser altamente tolerantes a condiciones adversas, particularmente sequía y radiación ultravioleta (UV) (Paulino-Lima *et al.*, 2013).

2.4.1.2 Estepa Patagónica

Por otra parte, la estepa semi-árida de la Patagonia chilena comprende solo una porción del territorio patagón, siendo poco explorado y descrito según la literatura. Se caracteriza principalmente por ser una zona donde las condiciones de aridez de este ambiente están determinadas por las precipitaciones además de otros factores como la composición del suelo (Paruelo *et al.*, 1988).

Los suelos patagones derivan en su mayoría de material volcánico y glaciario, presentando un alto porcentaje de grava y piedras, lo que afecta directamente el drenaje de los suelos, reduciendo la capacidad de campo de estos en alrededor de un 50% (Paruelo *et al.*, 1988; Sala *et al.*, 1989). Al igual que en zonas áridas, la vegetación de la región semi-árida de la Patagonia chilena se encuentra dominada por especies herbáceas y arbustivas (Sala *et al.*, 1989).

La diversidad bacteriana de la Patagonia chilena no ha sido descrita aun, sin embargo las características de la estepa patagónica chilena son muy similares a las del país vecino, donde se ha descrito la presencia de géneros como *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Nocardia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, y *Sphingobacterium* (Acuña *et al.*, 2010, 2010; Olivera *et al.*, 2005).

2.4.2 Condiciones fértiles: Región de La Araucanía

La Región de La Araucanía presenta características climáticas descritas como un régimen templado-lluvioso con influencias oceánicas (BCN, 2013). En términos pluviométricos, la Región de La Araucanía se caracteriza por tener precipitaciones que varían entre 1500 a 2500 mm anuales (Amigo y Ramírez, 1998; BCN, 2013), y periodos secos que duran entre 1 a 2 meses entre Diciembre y Febrero.

Los suelos de la Región de La Araucanía se caracterizan por ser mayoritariamente volcánicos (Andisoles o Ultisoles) (Escudey *et al.*, 2001; Jorquera *et al.*, 2010; Langer *et al.*, 2007). Estos suelos a su vez, presentan alto contenido de materia orgánica, altos niveles de Al y Mn extraíbles y baja disponibilidad de Pi, Ca y Mo. Bajo ese precepto, presentan una alta capacidad de intercambio catiónico y un pH inferior a 5.5 (Borie y Zunino, 1983; Langer *et al.*, 2007). La abundante presencia de cationes como Al y Mn se debe a su naturaleza volcánica (Langer *et al.*, 2007). La baja disponibilidad de P, se debe principalmente a la interacción de inositol-fosfatos con cationes de Al y Fe presentes en el suelo, por lo que gran parte de P aplicado mediante fertilización es retenido en el suelo, donde el P_o puede representar más del 50% del P total del suelo (Borie y Rubio, 2003).

Jorquera *et al.*, 2008a, aislaron bacterias mineralizadoras de fitato y solubilizadoras de fosfato, donde mediante rRNA 16s reportaron la presencia de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y

Pantoea en la rizósfera de plantas crecidas en un suelo andisol. Asimismo, Jorquera *et al.*, 2010, mediante DGGE observaron que en las comunidades bacterianas rizosféricas de andisoles de la Región de La Araucanía predomina la presencia de los *phylum Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, y *Acidobacteria*. Dichos resultados, se ven complementados con un estudio realizado también por Jorquera *et al.*, 2011, donde en el mismo tipo de suelos aislaron *Bacillus* y *Paenibacillus* que presentaban el gen codificante para BPP, evidenciando la inducción que ejerce la presencia de fitato en la producción de BPP.

3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

3.1 Hipótesis

- Las condiciones ambientales, la planta y el tipo de suelo en el cual se desarrolla la rizósfera, son capaces de afectar la composición y la estructura de las comunidades rizobacterianas que en esta se desarrollan. Estas condiciones son una poderosa herramienta para la selección y adaptación de rizobacterias con potenciales mecanismos PGPR, fuertemente arraigadas a suelos desfavorables, permitiendo el desarrollo de flora en ambientes adversos.

3.2 Objetivo General

- Explorar la composición y estructura de las comunidades rizobacterianas en suelos chilenos con condiciones áridas y condiciones fértiles y la presencia de bacterias con potenciales mecanismos PGPR en el Desierto de Atacama, la estepa Patagónica y la Región de La Araucanía.

3.3 Objetivos Específicos

- Aislar PGPR con la capacidad de degradar fitato desde la rizósfera de plantas de *Chuquiraga* sp. (desarrolladas en la estepa Patagónica) y *Atriplex* sp. (desarrolladas en el Desierto de Atacama) y plantas de *Lolium perenne* L., *Trifolium repens* L., *Taraxacum officinale*, *Avena sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Senecio* sp. y *Cortaderia* sp. desarrolladas en suelos de la Región de La Araucanía, Chile.
- Aislar PGPR con la capacidad degradar ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desde la rizósfera de plantas de *Chuquiraga* sp. (desarrolladas en la estepa Patagónica) y *Atriplex* sp. (desarrolladas en el Desierto de Atacama) y plantas de *Lolium perenne* L., *Trifolium repens* L., *Taraxacum officinale*, *Avena sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Senecio* sp. y *Cortaderia* sp. desarrolladas en suelos de la Región de La Araucanía, Chile.

4. METODOLOGIA

4.1 Muestreo de suelos

Muestras de rizósfera (raíces y suelo adherido) (1 kg.) fueron recolectadas desde zonas con régimen árido, semi-árido y templado lluvioso de Chile. Se colectaron 3 muestras rizosfericas de *Atriplex* sp. crecidos en el Desierto de Atacama (AD), Región de Antofagasta (22°S, 68°O); 3 muestras rizosfericas de *Chuquiraga* sp. provenientes de la estepa Patagónica (PT) (Región de Magallanes; 53°S, 70°O); 3 muestras rizosfericas de *Senecio* sp. y *Cortaderia* sp. fueron tomadas desde el Parque Nacional Conguillio (NP) (Región de La Araucanía, 38°S, 71°O); 3 muestras rizosfericas de una pastura naturalizada por 10 años de *Lolium perenne* L., *Trifolium repens* L., y *Taraxacum officinale* (Región de La Araucanía, 38°S, 71°O); 3 muestras rizosfericas de *Lolium perenne* L. (Región de la Araucanía, 38°S, 72°O); 3 muestras rizosfericas de plántulas de dos meses de *Avena sativa* L. (CC1) (Región de La Araucanía, 38°S, 71°O) y 3 muestras rizosfericas de *Triticum aestivum* L. (CC2) (Región de La Araucanía, 38°S, 72°O).

4.2 Determinación de unidades formadoras de colonias bacterianas

Se realizó una suspensión de 1 g de muestras de rizósfera (por triplicado) en 25 mL de solución salina (NaCl 0.85%) que fue sonicada por 30 segundos a 130 watts (20 kHz). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, las que fueron sembradas en los medios medio mínimos NM-1 (0.5 g l⁻¹ D-glucosa, 0.5 g l⁻¹ polipeptona, 0.5 g l⁻¹ Na-glutamato, 0.5 g l⁻¹ extracto de levadura, 0.44 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0.1 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.1 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 15 g l⁻¹ agar bacteriológico, suplementado con 1 mL de solución de vitaminas (1 g l⁻¹ nicotinamida, 1 g l⁻¹ betaxina, 0.05 g l⁻¹ biotina, 0.5 g l⁻¹ ácido 4-aminobenzoico, 0.01 g l⁻¹ vitamina B₁₂, 0.5 g l⁻¹, vitamina B₅, 0.5 g l⁻¹, vitamina B₆ y 0.5 g l⁻¹ ácido fólico) (Sigma-Aldrich) (Nakamura *et al.*, 1995) y Extracto de suelo (SE) preparado con 500 mL l⁻¹ de extracto de suelo (1 kg de suelo proveniente desde la región de La Araucanía, [38°S, 72°O] mezclado con 2 g l⁻¹ de 50 mM NaOH y 15 g l⁻¹ de agar bacteriológico (Hamaki *et al.*, 2005).

Ambos medios de cultivo fueron suplementados con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ciclohexamida (Sigma-Aldrich) para prevenir crecimiento fúngico.

El conteo del total de bacterias heterotróficas cultivables fue estimado luego de 4 – 6 días a 30°C . Desde este punto, 760 unidades formadoras de colonias representativas fueron seleccionadas al azar y transferidas a tubos de 5 mL y placas de agar con medio mínimo suplementado con Na-fitato ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24} \text{P}_6 \cdot x\text{Na} \cdot y\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich) y ACC ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$; Calbiochem®) como fuentes únicas de P y carbono-nitrógeno, respectivamente.

4.3 Comunidades microbianas y su composición en la rizósfera

Las comunidades bacterianas que componen la rizósfera de los tres ambientes muestreados fueron analizadas mediante electroforesis en gradiente de gel denaturante (DGGE), siguiendo la metodología descrita por Jorquera *et al.*, 2010. El DNA total de las muestras de suelo fue extraído mediante Ultraclean Soil DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las reacciones fueron llevadas a cabo mediante touchdown PCR utilizando los primers EUB f933 (5'-GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G-3') y EUB r1387 (5'-GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG-3') (Iwamoto *et al.*, 2000), en $100 \mu\text{L}$ de volumen final (5X Flexi GoTaq Green PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 μM Primer EUB f933, 0,2 μM Primer EUB r1387, 1,5 U GoTaq Taq Polymerase (Promega Inc.), 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de templado) y se utilizó el siguiente programa: 95°C por 10 min, 65°C por 1 min (disminuyendo $0,5^\circ\text{C}$ por ciclo hasta los 55°C) y 72°C por 3 min. Luego se repitieron 10 ciclos con 55°C como temperatura de hibridación, luego 94°C por 1 min, 72°C por 3 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos PCR fueron corridos en geles de agarosa-TAE 1,5% teñidos con bromuro de etidio a 130 v por 30 min.

Para DGGE, se cargaron $30 \mu\text{L}$ de producto PCR en un gel de poliacrilamida al 6% (p/v) con gradiente denaturante 40 – 70% (Urea 7 M y 40% formamida). La electroforesis se realizó durante 12 horas a 100 v, los geles fueron teñidos con SYBR Gold (Invitrogen, Co.) por 30 min y fotografiados en transluminador UV. Las bandas de interés fueron recuperadas, purificadas, re-amplificadas y enviadas a secuenciar a Macrogen Inc, Korea.

Los perfiles de bandas del DGGE fueron analizados mediante un dendrograma mediante el software propietario Phoretix 1D (TotalLab Ltd). Utilizando los resultados entregados por el dendrograma en forma de matriz, el análisis de presencia y abundancia de grupos bacterianos se llevó a cabo mediante un análisis no métrico de escala multidimensional (non-metric multidimensional scaling) utilizando el software gratuito PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis.

4.4 Aislamiento de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas

4.4.1 Aislamiento de rizobacterias degradadoras de fitato

Para la selección de bacterias solubilizadoras de fitato se centrifugo 1 mL de cultivo bacteriano en medio LB a 4000 rpm. por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de solución salina 0,85%. Este proceso se repitió tres veces bajo cámara de flujo laminar y se sembraron 10 μ L (por triplicado) en medio PSM (Phytase-screening médium) compuesto por 10 g l⁻¹ D-glucosa, 4 g l⁻¹ Na-fitato, 2 g l⁻¹ CaCl₂, 5 g l⁻¹ NH₄NO₃, 0.5 g l⁻¹ KCl, 0.5 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.01 g l⁻¹, FeSO₄·7H₂O, y 0.01 g l⁻¹ MnSO₄·H₂O y 15 g l⁻¹ de agar bacteriológico (Kerovuo *et al.*, 1998). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 3 a 4 días donde se evaluó la formación de halo, evidenciando la actividad fitasa por las bacterias inoculadas.

4.4.2 Aislamiento de rizobacterias degradadoras de 1-aminociclopropano-1-carboxilato

Se centrifugo 1 mL de cultivo bacteriano en medio LB a 4000 rpm. por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de solución salina 0,85%. Este proceso se repitió tres veces bajo cámara de flujo laminar. Se sembraron (por triplicado) 10 μ L en medio DF completo (4 g l⁻¹ KH₂PO₄, 6 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 0.2 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 2 g l⁻¹ ácido gluconico, 2 g l⁻¹ ácido cítrico, y 1 mL de solución de trazas 0.001 g l⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 0.01 g l⁻¹ H₃BO₃, 0.011 g l⁻¹ MnSO₄·H₂O, 0.125 g l⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0.078 g l⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0.01 g l⁻¹ MoO₃, 2.0 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ como fuente de N y 2.0 g l⁻¹ de glucosa como fuente de C. Se incubaron los tubos en agitador térmico a 30°C y 100 rpm y se evaluó el crecimiento bacteriano a 1, 3 y 5 días.

Una vez confirmado el crecimiento bacteriano en medio DF completo, se repitió el protocolo de lavado y se sembraron (por triplicado) 10 μL en medio DF con ACC como fuente de C y N. (Penrose y Glick, 2003).

4.4.3 Detección de genes de Beta-propeller fitasa y 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa

Doscientas cepas representativas que se desarrollaron en los medios PSM y DF fueron escogidas al azar, y se les realizó Colony PCR para examinar la presencia de genes putativos codificantes para BPP y ACC deaminasa.

4.4.3.1 Detección de genes codificantes para Beta-propeller fitasa

Para examinar la presencia de genes putativos codificantes para BPP se utilizaron los primers degenerados BPPf (5'-GAC GCA GCC GAY GAY CCN GCN ITN TGG-3'), BPPr (5'-CAG GSC GCA NRT CIA CRT TRT T-3') (Huang *et al.*, 2009) y DP1 (5'-GAY GCI GCI GAY GAY CCI GC-3') y DP2 (5'-TCR TAY TGY TCR AAY TCI C-3') (Tye *et al.*, 2002). Para el set de primers BPPf/BPPr se realizaron reacciones de 25 μL (5X Flexi GoTaq PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl_2 , 0,7 μM Primer BPPf, 0,7 μM Primer BPPr, 2,5 U GoTaq Taq Polymerase [Promega Inc.] y 25 ng μl^{-1} de templado), con el siguiente programa: 95°C por 5 min, 8 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 30 s (disminuyendo 1°C por ciclo) y 72°C por 30 s. Luego, 27 ciclos de 95°C por 30 s, 48°C por 30 s y 72°C por 30 s, finalizando con 72°C por 5 min de extensión final (Huang *et al.*, 2009). Para el set de primers DP1/DP2 se realizaron reacciones de 25 μL (5X Flexi GoTaq PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl_2 , 0,5 μM Primer DP1, 0,5 μM Primer DP2, 2,5 U GoTaq Taq Polymerase [Promega Inc.] y 25 ng μl^{-1} de templado). El programa utilizado fue: 95°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 45 s, 47°C por 45 s, 72°C por 1' y 75°C por 5 min de extensión final (Jorquera *et al.*, 2011). Los productos fueron corridos en geles de agarosa-TAE 1,5% teñidos con bromuro de etidio a 130 v por 30 min y observados en transluminador UV para verificar amplificación.

4.4.3.2 Detección de genes codificantes para 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa

La detección de genes putativos codificantes para ACC deaminasa (*acdS*) se realizó mediante PCR utilizando los primers degenerados F1936 (5'-GHG AMG ACT GCA AYW SYG GC-3'), F1937 (5'-MGV AAG CTC GAA TAY MTB RT-3'), F1938 (5'-ATC ATV CCV TGC ATB GAY TT-3') y F1939 (5'-GAR GCR TCG AYV CCR ATC AC-3') descritos por Blaha *et al.*, 2006 en las siguientes combinaciones: F1936/F1938, F1936/F1939, F1937/F1938 y F1937/F1939 según las condiciones descritas por Jorquera *et al.*, 2012. Se realizaron reacciones de 25 μ L (5X Flexi GoTaq PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 μ M Primer F, 0,3 μ M Primer R, 2,5 U GoTaq Taq Polymerase [Promega Inc.]) con el siguiente programa: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, y 72°C por 2 min y un ciclo de extensión final de 75°C por 5 min. Los productos fueron corridos en geles de agarosa-TAE 1,5% teñidos con bromuro de etidio a 130 v por 30' y observados en transluminador UV para verificar amplificación.

Finalmente, 25 cepas aisladas que amplificaron los fragmentos descritos según literatura aisladas desde los tres ambientes mencionados fueron seleccionadas como PGPR putativas, se verifico su pureza mediante siembra por estrías en placas de medio LB y se almacenaron en medio LB/Glicerol (70/30%) a -80°C para posteriores análisis.

4.5 Extracción de ADN genómico

Se realizó un protocolo de extracción de ADN genómico (Wilson, 1997) modificado en este estudio para confirmar la presencia de los genes en muestras purificadas de DNA. El protocolo consto de los siguientes pasos: Centrifugado de 1.5 mL de cultivo bacteriano saturado por 5 min a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet formado en 567 μ L de buffer TE, 30 μ L de SDS 10% y 3 μ L de proteinasa K 20 mg mL⁻¹ (volumen final: 600 μ L), luego se agito en vortex por 5 s y se incubo a 37°C por 1 h. Posteriormente se añadieron 100 μ L de NaCl 5M y 80 μ L de solución CTAB/NaCl, se llevó a vortex por 5 s y se incubo por 10 min a 65°C. Se añadieron 700 μ L de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y se centrifugo durante 5 min a 13000 rpm y 25°C. Se rescató el sobrenadante (400 μ L), en un tubo nuevo se le añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) y nuevamente se centrifugo a 13000 rpm durante 5 min

y 25°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y el ADN genómico se precipitó mediante 0.6 volúmenes de isopropanol. Los tubos fueron llevados a centrifuga a 10000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado con etanol 70%, secado al aire y luego llevado a concentrador por 15 min a 30°C. Finalmente el ADN genómico fue resuspendido en Buffer TE pH 8.

4.5.1 Identificación de Rizobacterias promotoras del crecimiento putativas

Las 25 cepas seleccionadas como PGPR putativas fueron identificadas parcialmente mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Mediante PCR se amplificaron fragmentos del gen utilizando los primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Peace *et al.*, 1994). Las reacciones se realizaron en 55 µL de volumen final (5X Flexi GoTaq Colorless PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM Primer 27f, 0,2 µM Primer 1492r, 1,5 U GoTaq Taq Polymerase (Promega Inc.), 25 ng µL⁻¹ de templado) y se llevaron a termociclador con el siguiente programa: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 2 min y 75°C por 5 min para extensión final. Posteriormente se utilizaron 2 µL para cuantificación espectrofotométrica (concentración, relación 260/280 y 230/260). Se verificó amplificación mediante corrida en geles de agarosa-TAE 1,5% teñidos con bromuro de etidio a 130 v por 30 min.

Los productos de PCR fueron transferidos a tubos eppendorf de 1,5 mL y enviados a secuenciar en ambos sentidos a MacroGen Inc, Korea.

4.6 Producción de ácido indol acético por Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas

La producción de AIA se determinó colorimétricamente a partir de los 25 aislados PCR positivos a 530 nm utilizando el reactivo Salkowski (Patten y Glick, 2002). Se cultivaron los aislados bacterianos (por triplicado) en agitación por 2 días a 30°C en medio LB suplementado con triptófano 1 mg ml⁻¹ como precursor del AIA. Posterior a la incubación, los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4°C, 1 mL de sobrenadante fue combinado con 2 mL de

reactivo Salkowski (150 mL de H_2SO_4 98%, 7,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M y 250 mL de agua destilada) e incubados a temperatura ambiente por 30 min. La cuantificación de AIA fue llevada a cabo con una curva estándar con concentraciones conocidas de AIA puro (Sigma-Aldrich, Co.) en un lector de microplacas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific).

5. RESULTADOS

5.1 Recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas

El recuento total de rizobacterias heterotróficas cultivables en medio NM-1 reveló mayor abundancia en la rizósfera de suelos muestreados en la Región de la Araucanía, ($1-10 \times 10^6$ UFC g⁻¹ suelo) comparado con los recuentos bacterianos del Desierto de Atacama y la estepa Patagónica ($1-5 \times 10^5$ UFC g⁻¹ suelo). Resultados similares fueron observados en el medio SE (Extracto de suelo), sin embargo en este medio solo se observó crecimiento bacteriano en muestras extraídas desde la Región de La Araucanía.

5.2 Comunidades microbianas, su composición y estructura

La secuenciación de 36 bandas del análisis DGGE de las comunidades rizosféricas (Figura 4; Anexo 1) reveló la presencia de *Enterobacteriales* en todos los suelos rizosféricos analizados (bandas 5, 11, 13, 14, 15, 20, 21, 22, 25, 31, 33, 34 y 36). Asimismo, *Sphingobacteriales* solo fueron observados en muestras tomadas desde la Región de La Araucanía (bandas 10, 19 y 23). *Actinomycetales* y *Rhizobiales* fueron detectados en suelos fértiles (bandas 4, 9, 17, 18 y 24) y áridos (bandas 27, 28, 30, 32), con excepción de un suelo fértil no manipulado durante 10 años (PS1), donde no se encontró ninguno de los dos géneros mencionados. La presencia de *Pseudomonales* fue encontrada en el Desierto de Atacama y también en una muestra de la Región de La Araucanía.

El dendrograma y el análisis nMDS (Figura 5) revelaron grandes diferencias entre los ambientes de acuerdo a su fertilidad, separándose en tres grupos. Patagonia, Desierto de Atacama y Región de La Araucanía. En el grupo correspondiente al Desierto de Atacama, se aprecia la cercanía con comunidades rizobacterianas de dos suelos de la Región de La Araucanía, PS1 corresponde a un suelo no manejado desde hace 10 años aproximadamente. De igual NP tampoco presenta manejo agronómico.

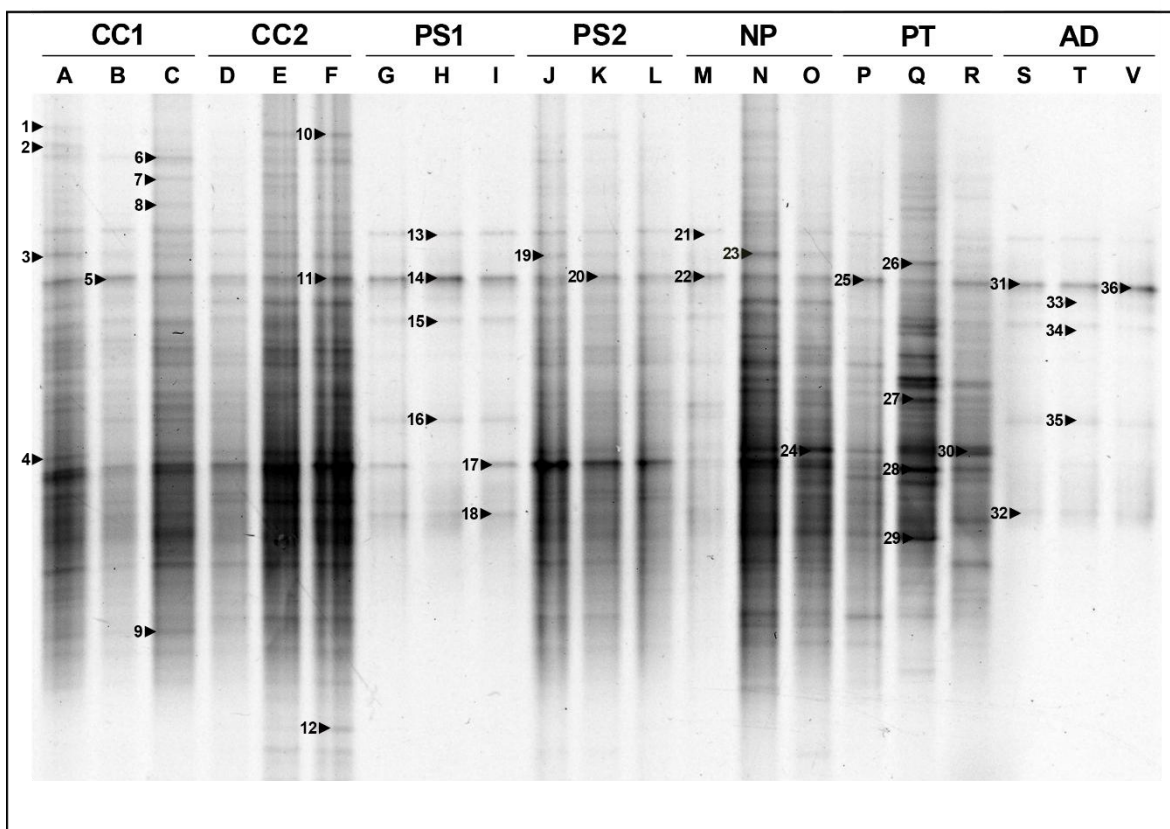


Figura 4. Bandas seleccionadas para secuenciación a partir de DGGE

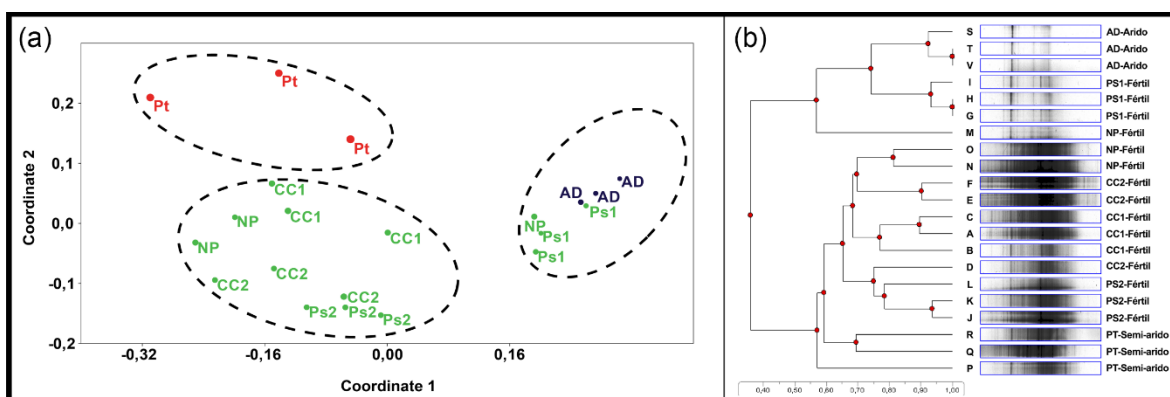


Figura 5. (a): Análisis nMDS de las comunidades rizobacterianas; (b): Dendrograma originado a partir de DGGE.

5.3 Aislamiento de PGPR putativas

En todas las rizósferas analizadas fue posible detectar rizobacterias con la capacidad de solubilizar el fitato o utilizar ACC como fuente de C-N (Figuras 6 y 7). En cultivos realizados en medio PSM, suelos fértiles de la región de La Araucanía (CC1, CC2, PS1 y PS2) revelaron mayor presencia de genes codificantes para BPP con un 7-29% de abundancia. En muestras provenientes de suelos áridos (AD, PT) y una muestra de suelo fértil no manejado de la Región de La Araucanía (NP) solo se encontró la presencia del gen en 2-22% de las cepas estudiadas. En relación a la presencia del gen *acdS* en medio PSM se encontró en un 9-27% y un 12-32% en aislados fértiles de la región de La Araucanía y los suelos áridos (AD, NP y PT) respectivamente.

En medio DF se encontró mayor abundancia del gen *acdS*, con un 21-29% y 6-28% para suelos productivos (CC1, CC2, PS1 y PS2) y ambientes áridos, semi-áridos, además de un suelo de La Región de La Araucanía no intervenido (AD, NP y PT). Respecto a la presencia de genes codificantes para BPP, existe 0-26% y 0-18% de abundancia para las distribuciones ya mencionadas.

Se obtuvieron 25 aislados bacterianos con potenciales rasgos PGPR a partir de las distintas rizósferas analizadas (Tabla 1).

Tabla 1. Aislados positivos para los genes Beta-propeller fitasa (BPP) y *acdS*

Suelos fértiles	BPP	<i>acdS</i>	Suelos áridos	BPP	<i>acdS</i>
CC1-ACC-3.13		+	AD-PHY-80°C-7.10		+
CC1-PHY-80°C-4.22	+		PT-ACC-10.2		+
CC1-PHY-80°C-4.26	+		PT-PHY-80°C-11.1		+
CC1-ACC-3.12		+	PT-PHY-8.16		+
CC2-ACC-3.24	+		AD-PHY-80°C-7.21	+	
CC1-PHY-80°C-4.24	+		PT-ACC-10.6		+
CC1-ACC-3.14		+	PT-PHY-8.9	+	
PS2-ACC-5.10		+	PT-PHY-10.3		+
CC1-ACC-3.16	+	+	PT-PHY-10.1		+
CC1-ACC-3.3		+			
NP-PHY-2.8		+			
CC1-ACC-3.4		+			
CC2-PHY-80°C-4.20		+			
CC2-PHY-4.4	+				
PS1-PHY-80°C-6.18		+			
PS2-ACC-5.12		+			

CC: Cultivo de cereales; Ps: Pastura; NP: Parque Nacional Conguillio; AD: Desierto de Atacama; PT: Estepa Patagónica

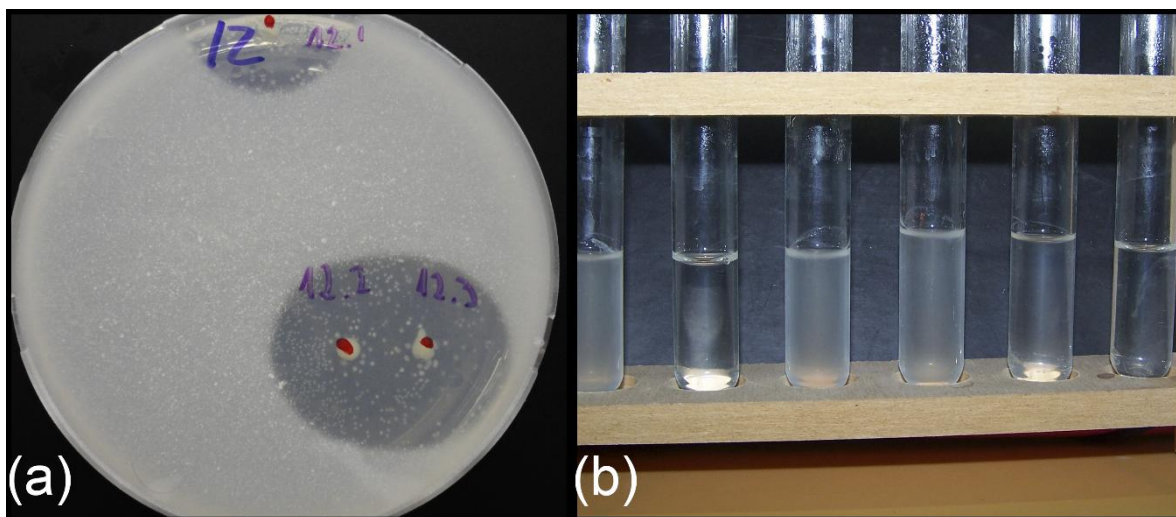


Figura 6. (a): Medio PSM con bacterias que utilizan fitato como fuente de P; (b): Medio DF-ACC con aislados que presentan actividad ACC deaminasa

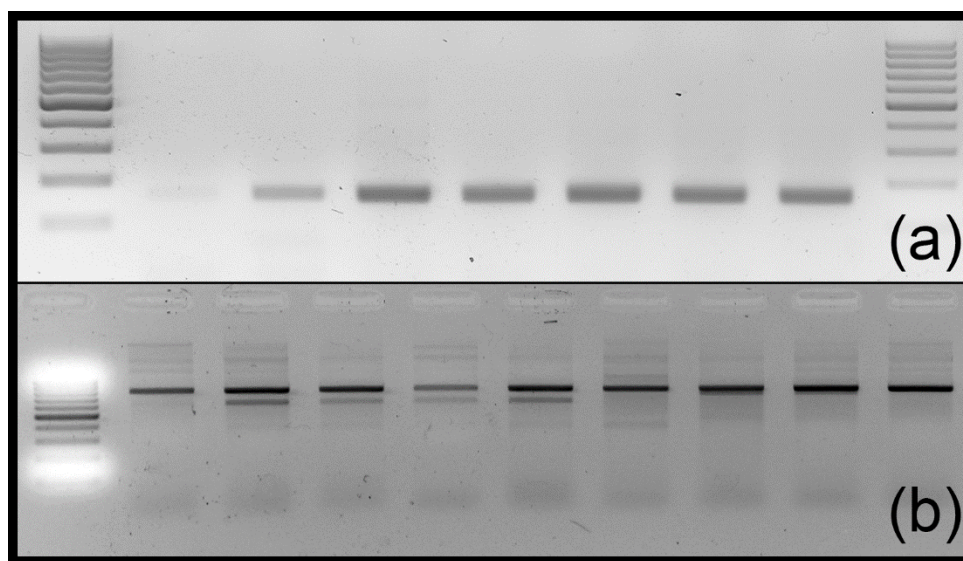


Figura 7. (a) Electroforesis de producto PCR del gen codificante para BPP; (b): Electroforesis de producto PCR del gen *acdS*.

5.4 Identificación de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas

5.4.1 Extracción de ADN genómico

El protocolo de extracción de ADN genómico fue efectivo con los 25 aislados seleccionados, presentando todos concentraciones de DNA superiores a los 50 ng μl^{-1} y valores entre 1.8 y 2.0 en la relación 260/280.

5.4.2 Caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas

La secuenciación de los 25 aislados seleccionados revelo la abundancia del orden *Enterobacteriales* (Anexo 2). Del total de aislados solo dos se encontraron fuera de este orden, correspondientes a un representante del orden *Bacilliales* y otro del orden *Pseudomonales*. Un aislado no pudo ser secuenciado.

5.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas productoras de ácido indol-3-acético

Los 25 aislados bacterianos analizados para la producción de AIA tienen la capacidad de producir esta fitohormona en presencia de triptófano (Tabla 2). En CC1, CC2, PS1, PS2 y NP la producción de AIA fue superior que en los otros dos ambientes (desde 7.8 a 67.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Promedio: 44.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$), en comparación a AD y PT donde las concentraciones fueron 50% menores (AD: desde 14,53 a 22,56 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Promedio: 18,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (PT: desde 9,19 a 21,38 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Promedio: 14,77 $\mu\text{g ml}^{-1}$). La prueba bioquímica no pudo ser realizada al aislado AD-PHY-80°C-7.21.

Tabla 2. Producción de AIA en bacterias portadoras de los genes Beta-propeller fitasa (BPP) y *acdS*.

Suelo Fertil*	Producción de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Suelo Arido**	Producción de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CC1-ACC-3.13	67,71 \pm 6,85 ^a	AD-PHY-80°C-7.10	22,56 \pm 6,73
CC1-PHY-80°C-4.22	65,74 \pm 13,51	PT-ACC-10.2	21,38 \pm 17,64
CC1-PHY-80°C-4.26	62,10 \pm 21,45	PT-PHY-80°C-11.1	18,47 \pm 1,40
CC1-ACC-3.12	60,51 \pm 4,86	PT-PHY-8.16	15,93 \pm 0,36
CC2-ACC-3.24	60,40 \pm 6,47	AD-PHY-80°C-7.21	***
CC1-PHY-80°C-4.24	54,77 \pm 30,33	PT-ACC-10.6	14,26 \pm 3,88
CC1-ACC-3.14	53,99 \pm 15,80	PT-PHY-8.9	12,59 \pm 1,50
PS2-ACC-5.10	49,94 \pm 2,90	PT-PHY-10.3	11,57 \pm 6,07
CC1-ACC-3.16	44,34 \pm 18,65	PT-PHY-10.1	9,19 \pm 1,87
CC1-ACC-3.3	40,36 \pm 7,86		
NP-PHY-2.8	35,28 \pm 0,30		
CC1-ACC-3.4	34,45 \pm 11,52		
CC2-PHY-80°C-4.20	32,63 \pm 9,86		
CC2-PHY-4.4	26,08 \pm 15,49		
PS1-PHY-80°C-6.18	23,05 \pm 7,18		
PS2-ACC-5.12	7,78 \pm 3,54		

^aLos valores representan el promedio \pm error estándar.

*Cultivo de cereales, pasturas y Parque Nacional Conguillio; **Desierto de Atacama, Estepa Patagónica.

***Medición no realizada.

6. DISCUSION

Dentro de los contrastes que presenta Chile a nivel climático, geográfico y vegetativo no es extraño que al estudiar distintas regiones del país encontremos diferencias significativas en distintos ámbitos. La Región de La Araucanía se caracteriza por ser una de las regiones del país con mayor actividad agropecuaria, por lo que la búsqueda de alternativas que permitan un aumento en la sustentabilidad de la producción agronómica (como mejoras en la recuperación de P orgánico y aumento de tolerancia a diversos estreses abióticos) es una prioridad a nivel científico. Este enfoque, va de la mano con el actual cambio climático que progresivamente afecta al planeta desde principios del siglo pasado, por lo que el desarrollo de nuevas tecnologías agronómicas debe ir a la par con combatir los efectos adversos a los que se enfrentan todos los ecosistemas al cambiar el clima. Respecto a lo mismo, en otras regiones de Chile (como el Desierto de Atacama y la estepa Patagónica) no se han efectuado estudios a nivel de rizósfera debido al poco interés productivo que estos generan.

6.1 Recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas

Para el Desierto de Atacama, el recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas arrojó resultados disimiles a aquellos encontrados por Paulino-Lima *et al.*, (2013), que reportaron 1×10^5 - 1×10^7 UFC g^{-1} . Distintamente, los resultados se identifican con Lester *et al.*, (2007). Es necesario mencionar que ambas publicaciones exploraron el número de UFC g^{-1} presentes a nivel de suelo y no precisamente a nivel de rizósfera. Además, esto puede ser atribuible como fue mencionado por Paulino-Lima *et al.*, (2013), al medio de cultivo utilizado, que podría afectar el crecimiento de diversas bacterias presentes en la muestra. A pesar de ello, el hecho de que los dos ambientes con suelos áridos (AD y PT) estudiados presenten rangos de UFC g^{-1} similares sugiere que en ambientes sin actividad intensiva el número de UFC g^{-1} disminuye, debido a que las condiciones edafoclimáticas no se permite el desarrollo de las comunidades microbianas de manera óptima. Dichos resultados, se reflejan en el análisis nMDS realizado. Asimismo, el hecho de que en medio SE (Extracto de suelo) no se haya observado crecimiento bacteriano de ambos ambientes, sugiere que las bacterias rizosféricas de ambos suelos áridos se encuentran fuertemente adaptadas

a esas condiciones. Esto indica que la férrea adaptación que estas comunidades rizobacterianas presentan. Debido al pequeño volumen de estudios de rizósfera en el Desierto de Atacama y la estepa Patagónica, es posible que los resultados varíen de acuerdo a las distintas plantas que se desarrollan en suelos áridos. Respecto al número de UFC g⁻¹ encontrado en rizósfera de la Región de La Araucanía, dichos resultados se condicen con aquellos obtenidos por Jorquera et al., (2008).

6.2 Comunidades rizobacterias, su composición y estructura

La secuenciación de bandas de DGGE revelo la presencia de los órdenes *Enterobacteriales*, *Sphingobacteriales*, *Actinomycetales*, *Rhizobiales* y *Pseudomonales* en ambientes con suelos fértiles y también áridos. La presencia de estos órdenes ha sido descrita anteriormente en plantas de interés agronómico como *Sorghum bicolor* L. (Ramond et al., 2013) y también en suelos donde se realizan cultivos rotativos de *Triticum durum*, *Zea mays*, *Avena sativa*, *Lolium perenne*, *Hordeum vulgare* y *Vicia faba* (Pastorelli et al., 2013) mediante PCR-DGGE. De igual modo, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria* y *Proteobacteria* han sido descritos como habitantes de la rizosfera de arbustos, hierbas y bosques tanto en desiertos como en montañas (Bardhan et al., 2012; Jorquera et al., 2012; Saul-Tcherkas et al., 2013).

Sphingobacteriales, *Enterobacteriales* y *Rhizobiales* han sido reportados de igual manera en suelos del sur de Chile (Briceño et al., 2010; Cea et al., 2010; Jorquera et al., 2010) y se sugiere que según los resultados obtenidos *Enterobacteriales*, *Actinomycetales* y *Rhizobiales* son géneros dominantes en los ambientes estudiados. Asimismo, *Sphingobacteriales* y *Pseudomonales* pueden ser menos abundantes, o específicos de algún tipo de rizosfera en particular. Para llegar a resultados más robustos, se hace necesaria la aplicación de técnicas modernas como Pirosecuenciación, de modo que podamos describir la rizosfera de diversos ambientes de Chile de manera más eficiente.

El dendrograma y análisis nMDS revelaron que la estructura de las comunidades rizobacterianas difiere significativamente de acuerdo a los ambientes con distintos regímenes climáticos estudiados, Marschner et al (2001) señalaron que el tipo de suelo, contenido de P, C y N, y el lugar de la raíz desde donde se muestree afectan directamente la composición de las comunidades. Todo esto puede alterar el número de UFC g⁻¹. Otros estudios reafirman lo señalado por Marschner et

al (2001) en función al contenido de C (Bausenwein *et al.*, 2008), así como por parámetros edáficos como el pH (Fierer y Jackson, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio no son atribuibles a un factor en particular, tomando en cuenta que solo se realizó una exploración de la diversidad rizobacteriana.

6.3 Aislamiento y caracterización de Rizobacterias promotoras del crecimiento putativas

En Chile, ya ha sido descrita anteriormente la presencia de PGPR en suelos de carácter fértil (Acuña *et al.*, 2013; Jorquera *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011; Shoebitz *et al.*, 2009). La obtención de aislados PGPR putativos para la producción de las enzimas Beta-propeller fitasa y ACC deaminasa desde todos los ambientes, revela que ambos mecanismos PGPR se encuentran ampliamente distribuidos, ejemplo de ello es la presencia de los genes estudiados en el Desierto de Mohave, California (Jorquera *et al.*, 2012). En la Región de La Araucanía, la forma más abundante de P_o corresponde a fitato (Borie y Rubio, 2003) debido a la alta presencia de iones en el suelo (como Fe³⁺, Ca²⁺ y Al²⁺). El aislamiento de cepas con la capacidad de producir la enzima Beta-propeller fitasa sugiere que a nivel de rizosfera existen mecanismos que permiten la degradación de fitato en suelos fértiles de carácter productivo en la Región de La Araucanía.

Respecto a la presencia del gen codificante para Beta-propeller fitasa en rizosfera de plantas del Desierto de Atacama sugiere que en condiciones adversas como lo es la aridez, se han desarrollado mecanismos para proveer a las plantas de las concentraciones de P necesarias para la supervivencia.

La gran abundancia del gen *acdS* en todas las muestras, revela que al igual que en el caso de la degradación del fitato, este mecanismo puede haberse desarrollado de forma paralela para ayudar a las plantas a tolerar diversos tipos de estrés, independiente del tipo de suelo. Para esta enzima en particular, se ha descrito su participación en procesos de fitorremediación (Arshad *et al.*, 2007), tolerancia a sequia (Belimov *et al.*, 2009), tolerancia a metales pesados (Ma *et al.*, 2011) y alta salinidad (Jalili *et al.*, 2009). Es así, que en Región de La Araucanía, esta enzima podría jugar un rol sobre la tolerancia a las altas concentraciones de Al²⁺ de los suelos (Mora *et al.*, 2006) y la progresiva sequia presente en los suelos de La Araucanía, consecuencia del cambio climático. En los suelos del Desierto de Atacama y la estepa Patagónica, la enzima podría actuar regulando el

estrés abiótico atribuible a salinidad y sequía, aumentando la tolerancia a este, y prolongando permitiendo indirectamente el desarrollo de la flora en estos suelos.

6.4 Producción de ácido indol-3-acético por Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal putativas

Interesantemente, una mayor producción AIA fue detectada en PGPR aisladas desde la Región de La Araucanía, desarrolladas principalmente en suelos de uso agronómico, en comparación con otros suelos que no han sido perturbados como el Desierto de Atacama o las estepas patagónicas. Esto, difiere de estudios realizados a los suelos productivos de la Región de La Araucanía (Martínez *et al.*, 2011), donde la aplicación intensiva de fertilizantes nitrogenados afectó la densidad poblacional de bacterias productoras de AIA. Asimismo, la alta presencia de cationes (Fe^{3+} , Al^{3+} y Mn^{2+}) característicos de los suelos de La Región de La Araucanía, ha exhibido un efecto inhibitorio en la producción de AIA en especies de *Bacillus* aisladas desde pasturas (Acuña y Jorquera, 2011). La menor producción de AIA en aislados obtenidos desde suelos áridos, sugiere que estos microorganismos podrían estar adaptados para apoyar el desarrollo de la planta con la cual interactúan, pero de manera que estas sean capaces de soportar las condiciones adversas de la rizósfera, por sobre un aumento del crecimiento en términos de biomasa. A pesar de ello, diversos estudios evidencian variabilidad en la producción de AIA en suelos desérticos: $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Gulati *et al.*, 2009); $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Goswami *et al.*, 2014) y $38 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Goswami *et al.*, 2014).

7. CONCLUSIONES

Es posible establecer diferencias entre la estructura y composición de las comunidades rizobacterianas de las tres rizósferas muestreadas (Desierto de Atacama, estepa Patagónica y Región de La Araucanía). Donde la Región de La Araucanía se caracterizó por presentar comunidades rizobacterianas de mayor tamaño, factor atribuible a mejores condiciones para su desarrollo y proliferación.

Existe presencia de rizobacterias con las potenciales características PGPR de interés (producción de la enzima Beta-propeller fitasa y 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa) en suelos rizosfericos con condiciones de aridez (Desierto de Atacama y estepa Patagónica) así como de fertilidad (Región de La Araucanía). Ambos mecanismos, así como también la producción de ácido indol-3-acético ya estaba descrita para la Región de La Araucanía. Sin embargo, para el Desierto de Atacama y la estepa Patagónica, estas características (que no habían sido descritas para ambos tipos de suelo), han permitido promover el crecimiento de plantas en condiciones adversas.

La presencia y abundancia de bacterias con rasgos PGPR de interés en ambientes adversos, podría ser una potencial fuente de rizobacterias que permitan un mejor aprovechamiento de suelos áridos, infértiles o desfavorables. La fuerte adaptación de estas rizobacterias, aparenta ser resultado de largos procesos de selección y adaptación naturales, los que también podrían ser aprovechados para aumentar la degradación de fitato y 1-aminociclopropano-1-carboxilato en la elaboración de productos Biofertilizantes. Dichos productos, podrían ser aplicados para combatir deficiencias de Pi, y estreses abióticos como sequía y alta salinidad.

A pesar de los resultados obtenidos, es necesario realizar estudios en profundidad de la rizósfera del Desierto de Atacama y la estepa Patagónica Chilena, a modo de reafirmar las conclusiones de este estudio, mediante la exploración de la microbiota rizosferica de los diversos tipos de planta que en ambos ambientes se desarrollan.

8. LITERATURA CITADA

- Abeles, F., Morgan, P., & Jr, M. S.** (1992). *Ethylene in plant biology*.
- Acuña, A. J., Pucci, G. N., & Pucci, O. H.** (2010). Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la Patagonia. *Ecosistemas*, 19(2), 125–136.
- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M., & Pucci, O.** (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30, 29–36.
- Acuña, J. J., Jorquera, M. a., Barra, P. J., Crowley, D. E., & de la Luz Mora, M.** (2013). Selenobacteria selected from the rhizosphere as a potential tool for Se biofortification of wheat crops. *Biology and Fertility of Soils*, 49(2), 175–185.
- Acuña, J., & Jorquera, M.** (2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11(3), 1–12.
- Amigo, J., & Ramírez, C.** (1998). A bioclimatic classification of Chile: woodland communities in the temperate zone. *Plant Ecology*, 136, 9–26.
- Anderson, G.** (1980). Assessing Organic Phosphorus in Soils. In *The role of phosphorus in the agronomy* (pp. 411–431).
- Araújo, M. B., & Rahbek, C.** (2006). How Does Climate Change. *Science*, 313, 1396–1397.
- Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J.** (2007). Regulation of Ethylene Biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 92–105.
- Arshad, M., Saleem, M., & Hussain, S.** (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, 25(8), 356–62.
- Ashley, K., Cordell, D., & Mavinic, D.** (2011). A brief history of phosphorus: from the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, 84(6), 737–46.
- Bardhan, S., Jose, S., Jenkins, M. A., Webster, C. R., Udawatta, R. P., & Stehn, S. E.** (2012). Microbial community diversity and composition across a gradient of soil acidity in spruce–fir forests of the southern Appalachian Mountains. *Applied Soil Ecology*, 61(0), 60–68.
- Bashan, Y., & Holguin, G.** (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9), 1225–1228.
- Bashan, Y., & Luz, E.** (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth — A Critical Assessment. *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 108, pp. 77–136).

- Bausenwein, U., Gattinger, A., Langer, U., Embacher, A., Hartmann, H.-P., Sommer, M., Schloter, M.** (2008). Exploring soil microbial communities and soil organic matter: Variability and interactions in arable soils under minimum tillage practice. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 67–77.
- BCN.** (2013). Clima y vegetación de la Región de La Araucanía.
- Beattie, G. A.** (2006). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In *Plant-associated bacteria* (pp. 1–56).
- Belimov, A. a, Dodd, I. C., Hontzeas, N., Theobald, J. C., Safronova, V. I., & Davies, W. J.** (2009). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *The New Phytologist*, 181(2), 413–23.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. a H. M.** (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(4), 1327–1350.
- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M. S., & Moëgne-Loccoz, Y.** (2006). Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(3), 455–470.
- Borie, F., & Rubio, R.** (2003). Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana Botanica*, 60(1), 69–78.
- Borie, F., & Zunino, H.** (1983). Organic matter-Phosphorus associations as a sink in P-Fixation processes in Allophanic soils of Chile. *Soil Biology and Biochemistry*, 15(5), 599–603.
- Briceño, G., Jorquera, M. a, Demanet, R., Mora, M. L., Durán, N., & Palma, G.** (2010). Effect of cow slurry amendment on atrazine dissipation and bacterial community structure in an agricultural Andisol. *The Science of the Total Environment*, 408(14), 2833–9.
- Brown, M. E.** (1972). Plant Growth Substances Produced by Micro-organisms of Soil and Rhizosphere, 443–451.
- Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R.** (1998). A Plant Growth-Promoting Bacterium That Decreases Nickel Toxicity in Seedlings, 64(10), 3663–3668.
- Cea, M., Jorquera, M., Rubilar, O., Langer, H., Tortella, G., & Diez, M. C.** (2010). Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol by *Anthracophyllum discolor* and its effect on soil microbial community. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 315–23.
- Cheng, C., & Lim, B. L.** (2006). Beta-propeller phytases in the aquatic environment. *Archives of Microbiology*, 185(1), 1–13.

- Chernin, L., & Glick, B. R.** (2012). Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management, 279–299.
- Choi, Y. M., Suh, H. J., & Kim, J. M.** (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20(4), 287–92.
- Clarke, J. D. a.** (2006). Antiquity of aridity in the Chilean Atacama Desert. *Geomorphology*, 73(1-2), 101–114.
- Connon, S. a., Lester, E. D., Shafaat, H. S., Obenhuber, D. C., & Ponce, A.** (2007). Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research*, 112(G4), G04S17.
- Cordell, D., Drangert, J., & White, S.** (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292–305.
- Cordell, D., Rosemarin, a, Schröder, J. J., & Smit, a L.** (2011). Towards global phosphorus security: a systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere*, 84(6), 747–58.
- Craine, J. M., Elmore, A. J., Olson, K. C., & Tolleson, D.** (2010). Climate change and cattle nutritional stress. *Global Change Biology*, 16, 2901–2911.
- Crick, H. Q. P.** (2004). The impact of climate change on birds. *Ibis*, 146, 48–56.
- Czarny, J. C., Grichko, V. P., & Glick, B. R.** (2006). Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. *Biotechnology Advances*, 24(4), 410–9.
- DeMenocal, P. B.** (2001). Cultural Responses to Climate Change During the Late Holocene. *Science*, 292(697).
- Di Castri, F., & Hajek, E.** (1976). *Bioclimatologia de Chile* (p. 14).
- Duan, J., Müller, K., Charles, T., Vesely, S., & Glick, B.** (2009). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbial Ecology*, 57(3), 423–36.
- Earl, K. D., Syers, J. K., & McLaughlin, J. R.** (1979). Origin of the effects of citrate, tartrate, and acetate on phosphate sorption by soils and synthetic gels. *Soil Science Society of America Journal*, 43(4), 674–678.
- Eitzinger, J., Štastná, M., Žalud, Z., & Dubrovský, M.** (2003). A simulation study of the effect of soil water balance and water stress on winter wheat production under different climate change scenarios. *Agricultural Water Management*, 61(3), 195–217.
- Escudey, M., Galindo, G., Förster, J. E., Briceño, M., Chang, A., & Fo, J. E.** (2001). Communications in Soil Science and Plant Analysis ASH-DERIVED SOILS IN CHILE. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32, 601–616.
- Ezawa, T., Smith, S., & Smith, F.** (2002). P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil*, 221–230.

- Fierer, N., & Jackson, R. B.** (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(3), 626–631.
- Fu, S., Sun, J., Qian, L., & Li, Z.** (2008). *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *151*(1), 1–8.
- Garrett, K. A., Dendy, S. P., Frank, E. E., Rouse, M. N., & Travers, S. E.** (2006). Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, *44*, 489–509.
- Glick, B.** (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, *21*(5), 383–393.
- Glick, B.** (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*.
- Glick, B., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J.** (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, *119*(3), 329–339.
- Glick, B., & Penrose, D.** (2004). The use of ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria to protect plants against the deleterious effects of ethylene. *Plant Surface Microbiology*, 133–144.
- Glick, B., Penrose, D., & Li, J.** (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, *190*(1), 63–8.
- Glick, B. R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*.
- Glick, B. R.** (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 367–74.
- Glick, B. R., Karaturović, D. M., & Newell, P. C.** (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(6), 533–536.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P., & Thakker, J. N.** (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, *169*(1), 66–75.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N.** (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 1–11.
- Govindasamy, V., Murugesan, S., Vellaichamy, M., Upendra, K., Pranita, B., Vikas, S., & Kannepali, A.** (2011). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In *Plant growth and health Promoting Bacteria* (pp. 333–364).
- Gray, E. J., & Smith, D. L.** (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(3), 395–412.

- Grichko, V., & Glick, B.** (2001). Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria, *39*, 11–17.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B.** (2010). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(5), 1231–1240.
- Gulati, A., Vyas, P., Rahi, P., & Kasana, R. C.** (2009). Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Current Microbiology*, *58*(4), 371–7.
- Gupta, A., Gopal, M., & Tilak, K. V.** (2000). Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology*, *38*, 856–862.
- Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Shibai, H.** (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *99*(5), 485–492.
- Hansen, J., Sato, M., & Ruedy, R.** (2012). Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(37), E2415–23.
- Harley, C. D. G., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Williams, S. L.** (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, *9*, 228–241. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x
- Hartley, A., & Chong, G.** (2005). 150 million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, northern Chile. *Journal of the Geological Society*, *162*, 421–424.
- Hays, G. C., Richardson, A. J., & Robinson, C.** (2005). Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology & Evolution (Personal Edition)*, *20*, 337–44.
- Helal, H., & Sauerbeck, D.** (1991). Soil and root phosphatase activity and the utilization of inositol phosphates as dependent on phosphorus supply. *Plant Roots and Their Environment*, 88–92.
- Hontzeas, N., Richardson, A. O., Belimov, A., Safronova, V., & Glick, B. R.** (2005). Evidence for Horizontal Transfer of Deaminase Genes Evidence for Horizontal Transfer of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 7556–7558.
- Howden, S. M., Soussana, J.-F., Tubiello, F. N., Chhetri, N., Dunlop, M., & Meinke, H.** (2007). Adapting agriculture to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(50), 19691–6.
- Huang, H., Shao, N., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Zhou, Z., Yao, B.** (2009). A novel beta-propeller phytase from *Pedobacter nyackensis* MJ11 CGMCC 2503 with potential as an aquatic feed additive. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(2), 249–59.

- Huang, H., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Shao, N., Wang, G., Yao, B.** (2009). Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1508–16.
- Hulme, M., Doherty, R., Ngara, T., New, M., & Lister, D.** (2001). African climate change: 1900-2100. *Climate Research*
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Borriss, R.** (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 148(7), 2097–2109.
- Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., & Suzuki, Y.** (2000). Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE, 32, 129–141.
- Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Rahmani, H. A., Sadaghiani, H. R., & Miransari, M.** (2009). Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*, 166(6), 667–74.
- Jha, C. K., Annapurna, K., & Saraf, M.** (2012). Isolation of Rhizobacteria from *Jatropha curcas* and characterization of produced ACC deaminase. *Journal of Basic Microbiology*, 52(3), 285–95.
- Jia, Y. J., Kakuta, Y., Sugawara, M., Igarashi, T., Oki, N., Kisaki, M., Honma, M.** (1999). Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(3), 542–9.
- Jorquera, M. a., Hernández, M., Martínez, O., Marschner, P., & de la Luz Mora, M.** (2010). Detection of aluminium tolerance plasmids and microbial diversity in the rhizosphere of plants grown in acidic volcanic soil. *European Journal of Soil Biology*, 46(3-4), 255–263.
- Jorquera, M., Crowley, D., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Romero, D., De La Luz Mora, M.** (2011). Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 163–72.
- Jorquera, M., Hernández, M., Rengel, Z., Marschner, P., & Luz Mora, M.** (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44(8), 1025–1034.
- Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., & de la Luz Mora, M.** (2008). Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. *Microbes and Environments*, 23(3), 182–191.
- Jorquera, M., Saavedra, N., Maruyama, F., Richardson, A., Crowley, D., Catrilaf, R., de la Luz Mora, M.** (2013). Phytate addition to soil induces changes in the abundance and expression of *Bacillus* β -propeller phytase genes in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(2), 352–60.

- Jorquera, M., Shaharouna, B., Nadeem, S., de la Luz Mora, M., & Crowley, D.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria associated with ancient clones of creosote bush (*Larrea tridentata*). *Microbial Ecology*.
- Kamala-Kannan, S., Lee, K.-J., Park, S.-M., Chae, J.-C., Yun, B.-S., Lee, Y. H., Oh, B.-T.** (2010). Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *Journal of Basic Microbiology*, 50(2), 200–5.
- Kausar, R., & Shahzad, S.** (2006). Effect of ACC-deaminase containing rhizobacteria on growth promotion of maize under salinity stress. *J Agric Soc Sci*, 216–218.
- Kelly, A. E., & Goulden, M. L.** (2008). Rapid shifts in plant distribution with recent climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11823–6.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J.** (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2079–2085.
- Kim, Y., Glick, B. R., Bashan, Y., & Ryu, C.** (2012). Enhancement of Plant Drought Tolerance by Microbes. In R. Aroca (Ed.), *Plant Responses to Drought Stress* (pp. 383–413). Berlin, Heidelberg, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kim, Y., Kim, H., Bae, K., Yu, J., & Oh, T.-K.** (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DSII. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(97), 2–7.
- Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M.** (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885–886.
- Lal, R.** (2004). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5677), 1623–7.
- Langer, H., Nandasena, K. G., Howieson, J. G., Jorquera, M., & Borie, F.** (2007). Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* associated with alfalfa in Chilean volcanic soils and their symbiotic effectiveness under acidic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 301–308.
- Lester, E. D., Satomi, M., & Ponce, A.** (2007). Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 704–708.
- Li, J., Ovakim, D. H., Charles, T. C., & Glick, B. R.** (2000). An ACC Deaminase Minus Mutant of *Enterobacter cloacae* UW4No Longer Promotes Root Elongation. *Current Microbiology*, 41(2), 101–105.
- Li, Z., Huang, H., Yang, P., Yuan, T., Shi, P., Zhao, J., Yao, B.** (2011). The tandemly repeated domains of a β -propeller phytase act synergistically to increase catalytic efficiency. *The FEBS Journal*, 278(17), 3032–40.

- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P., & Naylor, R. L.** (2008). Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5863), 607–10.
- Lott, J. N. A., Ockenden, I., Raboy, V., & Batten, G. D.** (2000). Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research*, *10*, 11–33.
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R.** (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *86*, 1–25.
- Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C., & Bloemberg, G. V.** (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, *81*, 373–383.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F.** (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 541–56.
- Lung, S.-C., Chan, W.-L., Yip, W., Wang, L., Yeung, E. C., & Lim, B. L.** (2005). Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization. *Plant Science*, *169*(2), 341–349.
- Ma, W., Sebestianova, S. B., Sebestian, J., Burd, G. I., Guinel, F. C., & Glick, B. R.** (2003). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, *83*(3), 285–91. doi:10.1023/A:1023360919140
- Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., & Freitas, H.** (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, *29*(2), 248–58.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Ryu, J., & Sa, T.** (2006). Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta*, *224*(2), 268–78.
- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R., & Crowley, D. E.** (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, *33*(11), 1437–1445.
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., & Luz Mora, M.** (2011). Influence of nitrogen fertilisation on pasture culturable rhizobacteria occurrence and the role of environmental factors on their potential PGPR activities. *Biology and Fertility of Soils*, *47*(8), 875–885.
- Martínez-Viveros, O.** (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *10*(3), 293–319.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R.** (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, *42*(6), 565–72.

- McDonnell, L., Plett, J. M., Andersson-Gunnerås, S., Kozela, C., Dugardeyn, J., Van Der Straeten, D., Regan, S.** (2009). Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Physiologia Plantarum*, 136(1), 94–109.
- McDowell, R. W., & Sharpley, a N.** (1995). Approximating phosphorus release from soils to surface runoff and subsurface drainage. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), 508–20.
- McKay, C. P., Friedmann, I. E., Gomez-Silva, B., Caceres-Villanueva, L., Andersen, D. T., & Landheim, R.** (2003). Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998. *Astrobiology*, 3(2), 393–406.
- McLeman, R., & Smit, B.** (2006). Migration as an Adaptation to Climate Change. *Climatic Change*.
- Menezes-Blackburn, D.** (2013). Phytases and phytase-labile organic phosphorus in manures and soils. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(2007).
- Mora, M. L., Alfaro, M. a., Jarvis, S. C., Demanet, R., & Cartes, P.** (2006). Soil aluminium availability in Andisols of southern Chile and its effect on forage production and animal metabolism. *Soil Use and Management*, 22(1), 95–101.
- Morgan, P. W., & Drew, M. C.** (1997). Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 620–630.
- Muday, G. K., Rahman, A., & Binder, B. M.** (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends in Plant Science*, 17(4), 181–95.
- Mullen, M. D.** (2005). PHOSPHORUS IN SOILS: Biological Interactions. In D. Hillel (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 210–216).
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., & Kamagata, Y.** (1995). *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 17–22.
- Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. a, Asenjo, J. a, Goodfellow, M., & Bull, A. T.** (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95(2), 121–33.
- Olesen, J. E., & Bindi, M.** (2002). Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy*, 16(4), 239–262.
- Olivera, N., Siñeriz, F., & Breccia, J. D.** (2005). *Bacillus patagoniensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from the rhizosphere of *Atriplex lampa* in Patagonia, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 443–7.

- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., & Caballero-Mellado, J.** (2009). ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6581–90.
- Pandey, A., Szakacs, G., Socol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., & Socol, V. T.** (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 77(3), 203–214.
- Paruelo, J. M., Aguiar, M. R., & Golluscio, R. A.** (1988). Soil water availability in the Patagonian arid steppe: gravel content effect. *Arid Land Research and Rehabilitation*, 2, 67–74.
- Pastorelli, R., Piccolo, R., Simoncini, S., & Landi, S.** (2013). New primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of nitrate-reducing bacterial community in soil. *Pedosphere*, 23(3), 340–349.
- Patten, C., & Glick, B.** (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795–3801.
- Paulino-Lima, I. G., Azua-Bustos, A., Vicuña, R., González-Silva, C., Salas, L., Teixeira, L., Lage, C.** (2013). Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama Desert, Chile. *Microbial Ecology*, 65(2), 325–35.
- Peace, T. A., Brock, K. V., & Stills, H. F.** (1994). Comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence of the putative agent of proliferative ileitis of hamsters. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 832–835.
- Penrose, D., & Glick, B.** (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 10–15.
- Powar, V. K., & Jagannathan, V.** (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 151(3), 1102–1108.
- Ramond, J.-B., Tshabuse, F., Bopda, C. W., Cowan, D. a., & Tuffin, M. I.** (2013). Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities associated with arable sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Plant and Soil*, 372(1-2), 265–278.
- Rashid, S., Charles, T., & Glick, B.** (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217–224.
- Reddy, N. R., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K.** (1982). Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res*, 28(1), 92.
- Richter, G. M., & Semenov, M. a.** (2005). Modelling impacts of climate change on wheat yields in England and Wales: assessing drought risks. *Agricultural Systems*, 84(1), 77–97.
- Roberts, R., & Diaz-Vial, C.** (1957). Los grandes grupos de suelos de Chile. *Agricultura Tecnica de Chile*, 8–36.

- Rodriguez, E., Porres, J. M., Han, Y., & Lei, X. G.** (1999). Different Sensitivity of Recombinant *Aspergillus niger* Phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 Acid Phosphatase (r-AppA) to Trypsin and Pepsin *in Vitro*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(2), 262–267.
- Rosenberg, N.** (1992). Adaptation of agriculture to climate change. *Climatic Change*, 385–405.
- Rosenzweig, C., & Parry, M.** (1994). Potential impact of climate change on world food supply. *Nature*, 367.
- Sala, O. E., Golluscio, R. a., Lauenroth, W. K., & Soriano, a.** (1989). Resource partitioning between shrubs and grasses in the Patagonian steppe. *Oecologia*, 81(4), 501–505.
- Santhanam, R., Okoro, C. K., Rong, X., Huang, Y., Bull, A. T., Andrews, B. a, Goodfellow, M.** (2012). *Streptomyces deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(3), 575–81.
- Saul-Tcherkas, V., Unc, A., & Steinberger, Y.** (2013). Soil Microbial Diversity in the Vicinity of Desert Shrubs. *Microbial Ecology*, 65(3), 689–699.
- Shah, S., & Li, J.** (1998). Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of microbiology*, 843, 833–843.
- Shaharoon, B., Arshad, M., & Zahir, Z. a.** (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 42(2), 155–9.
- Shahzad, S. M., Arif, M. S., Riaz, M., Iqbal, Z., & Ashraf, M.** (2013). PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology*, 57, 27–34.
- Shang, C., Stewart, J. W. B., & Huang, P. M.** (1992). pH effect on kinetics of adsorption of organic and inorganic phosphates by short-range ordered aluminum and iron precipitates. *Geoderma*, 53(1), 1–14.
- Sharpley, A. N., Kleinman, P. J. a, Heathwaite, a L., Gburek, W. J., Folmar, G. J., & Schmidt, J. P.** (2008). Phosphorus loss from an agricultural watershed as a function of storm size. *Journal of Environmental Quality*, 37(2), 362–8.
- Shimizu, M.** (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (Natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem*, 56(8), 1266–1269.
- Shoebitz, M., Ribaud, C. M., Pardo, M. A., Cantore, M. L., Ciampi, L., & Curá, J. A.** (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1768–1774.
- Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., Yim, W. J., & Sa, T.** (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity.

Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale, 49(4), 427–34.

- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M.** (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 205–240.
- Steen, I.** (1998). Phosphorus availability in the 21st century Management of a non-renewable resource. *Phosphorus & Potassium*, 217, 25–31.
- Suh, S., & Yee, S.** (2011). Phosphorus use-efficiency of agriculture and food system in the US. *Chemosphere*, 84(6), 806–13.
- Tang, J., Leung, A., Leung, C., & Lim, B. L.** (2006). Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1316–1324.
- Tarafdar, J., & Claassen, N.** (1988). Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 5(4).
- Thioulouse, J., Hafidi, M., Duponnois, R., Galiana, A., Lebrun, M., & Prin, Y.** (2012). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 79–95). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Thuiller, W.** (2007). Biodiversity: climate change and the ecologist. *Nature*, 448, 550–552.
- Traina, S. J., Sposito, G., Hesterberg, D., & Kafkafi, U.** (1986). Effects of pH and organic acids on orthophosphate solubility in an acidic, montmorillonitic soil. *Soil Science Society of America Journal*, 50(1), 45–52.
- Tran, H. T., Hurley, B. a., & Plaxton, W. C.** (2010). Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science*, 179(1-2), 14–27.
- Tubiello, F. N., Soussana, J.-F., & Howden, S. M.** (2007). Crop and pasture response to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19686–90.
- Turner, B. L., Mahieu, N., & Condron, L. M.** (2003). Quantification of Myo-Inositol Hexakisphosphate in Alkaline Soil Extracts By Solution 31P Nmr Spectroscopy and Spectral Deconvolution. *Soil Science*, 168(7), 469–478.
- Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M., & McKelvie, I. D.** (2002). Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357(1420), 449–469.
- Tye, a J., Siu, F. K. Y., Leung, T. Y. C., & Lim, B. L.** (2002). Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 190–207.

- Vadas, P. a, Kleinman, P. J. a, Sharpley, a N., & Turner, B. L.** (2005). Relating soil phosphorus to dissolved phosphorus in runoff: a single extraction coefficient for water quality modeling. *Journal of Environmental Quality*, 34(2), 572–80.
- Vats, P., & Banerjee, U. C.** (2004). Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 3–14.
- Vessey, J.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 571–586.
- Vohra, A., & Satyanarayana, T.** (2003). Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1), 29–60.
- Wang, E. T., & Martinez-Romero, E.** (2000). Sesbania herbacea-Rhizobium huautlense Nodulation in Flooded Soils and Comparative Characterization of S. herbacea-Nodulating Rhizobia in Different Environments. *Microb Ecol*, 40, 25–32.
- Wang, Y., & Dai, C.-C.** (2010). Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, 61(2), 207–215.
- Weisskopf, L., Heller, S., & Eberl, L.** (2011). Burkholderia species are major inhabitants of white lupin cluster roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7715–20.
- Whipps, J. M.** (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487–511.
- Wilson, K.** (1997). Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Vol. 529).
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, a, Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., van Loon, a P.** (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 367–73.
- Yadav, S., Tantwai, K., Prasad, L., Rajput, S., Bedekar, M. K., Kumar, S., Tiwari, S.** (2011). Molecular Cloning of Phytase Gene from *Bacillus subtilis* NCIM-2712, 3(7), 35–37.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E.** (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 35(132), 155–189.
- Yao, M.-Z., Zhang, Y.-H., Lu, W.-L., Hu, M.-Q., Wang, W., & Liang, a-H.** (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 1–14.
- Zhang, Y.-F., He, L.-Y., Chen, Z.-J., Wang, Q.-Y., Qian, M., & Sheng, X.-F.** (2011). Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 83(1), 57–62.

9. ANEXOS

Anexo 1. Taxonomía, y secuencias más cercanas reportadas en bases de datos según bandas DGGE.

Banda ^a	Grupo taxonomico ^b	Origen	Secuencia reportada mas cercana (No. Acceso)	Identidad ^c
1	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria, Sphingobacteriales</i>	CC1	Uncultures <i>bacteroidetes</i> from rhizosphere (FR820567)	91%
2	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria, Sphingobacteriales</i>	CC1	Uncultured <i>Flavitalea</i> sp. From rhizosphere (JX114387)	100%
3	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria, Sphingobacteriales</i>	CC1	Uncultured <i>Flavisolibacter</i> sp. from soil (KC172285)	99%
4	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales</i>	CC1	Uncultured <i>Bradyrhizobiaceae</i> bacterium (EF019846)	100%
5	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales</i>	CC1	<i>Citrobacter freundii</i> str. CF-5 isolated from soil (KF372588)	100%
6	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria, Sphingobacteriales</i>	CC1	Uncultured <i>bacteroidetes</i> from rhizosphere (JF703485)	100%
7	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales</i>	CC1	Uncultured endophytic bacterium from <i>Juncus trifidus</i> (HE815433)	99%
8	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales</i>	CC1	Uncultured <i>Chitinophagaceae</i> from rhizosphere (JX114430)	100%
9	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales</i>	CC1	Uncultured bacterium from mountain soil (KC554184)	98%
10	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales</i>	CC2	Uncultured bacterium from tar pit soil (JN645883)	100%
11	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	CC2	<i>Providencia vermicola</i> str. BAB-205 from soil (KF535113)	100%
12	<i>Proteobacteria; Deltaproteobacteria</i>	CC2	Uncultured bacterium from rhizosphere biofilm (GU375786)	98%
13	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	PS1	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-173 from soil (KF535108)	100%
14	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	PS1	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-1679 from contaminated soil (KF535142)	100%
15	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	PS1	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-1679 from contaminated soil (KF535142)	100%
16	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonales</i>	PS1	<i>Pseudomonas</i> sp. str. W14 from soil (KF560384)	100%
17	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales</i>	PS1	<i>Arthrobacter oxydans</i> from soil (EF154243)	99%
18	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales</i>	PS1	<i>Rhodococcus</i> sp. str. W34 from soil (KF560405)	99%
19	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales</i>	PS2	<i>Niabella</i> sp. str. ICM 1-15 from metal-contaminated agricultural soil (KF289904)	100%
20	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	PS2	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-188 from soil (KF535109)	100%
21	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	NP	<i>Rahnella aquatilis</i> str. VRT-251 from rhizosphere (KF201685)	100%
22	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	NP	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-1679 from contaminated soil (KF535142)	100%
23	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales</i>	NP	Uncultured <i>Flavisolibacter</i> sp. from ginger soil (KC172285)	100%
24	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales</i>	NP	<i>Bradyrhizobium</i> sp. str. UTPF23a from rice soil (AB769185)	99%
25	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	NP	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-1679 from contaminated soil (KF535142)	100%
26	<i>Acidobacteria</i>	PT	Uncultured soil bacterium from PAH-contaminated soil (FQ659446)	92%
27	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales</i>	PT	Uncultured alpha proteobacterium from antactic soil (EF221137)	100%
28	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales</i>	PT	<i>Bradyrhizobium</i> sp. str. M3 from sugar cane rhizosphere (KF113103)	100%
29	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria</i>	PT	Uncultured alpha proteobacterium from <i>Empetrum rubrum</i> soil (EF220599)	100%
30	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales</i>	PT	<i>Bradyrhizobium</i> sp. str. S452 from arsenic enriched soil (GU731241)	99%
31	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	AD	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-1679 from contaminated soil (KF535142)	100%
32	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales</i>	AD	<i>Rhodococcus erythropolis</i> str. VOL from soil (KF499507)	99%
33	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	AD	<i>Citrobacter freundii</i> str. BAB-1679 from contaminated soil (KF535142)	100%
34	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	AD	Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. str. OTU17 from soil	100%
35	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonales</i>	AD	<i>Pseudomonas</i> sp. str. W14 from soil (KF560384)	100%
36	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales</i>	AD	<i>Rahnella aquatilis</i> str. VRT-251 from rhizosphere (KF201685)	100%

^b La asignación filogenética esta basada en análisis de secuencias reportadas en el RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) o Base de datos GenBank de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

^c Basado en la secuenciación parcial del gen 16s rRNA y su comparación con la base de datos GenBank utilizando MegaBlast.

Anexo 2. Taxonomía, y secuencias más cercanas reportadas en bases de datos de aislados PGPR putativos.

Strain ^a	Taxonomic Group ^b	Closest relatives o cloned sequences (accession no.)	Identity ^c
CC1-ACC-3.13	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i> sp. strain YT4 (HQ143573)	100%
CC1-PHY-80°C-4.22	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain CL2 (KF747684)	99%
CC1-PHY-80°C-4.26	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain CL2 (KF747684)	99%
CC1-ACC-3.12	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> strain PYPB08 (JF346895)	100%
CC2-ACC-3.24	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium SAP840.3 (JX067715)	99%
CC1-PHY-80°C-4.24	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i> sp. strain YT4 (HQ143573)	99%
CC1-ACC-3.14	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain S7 (KF439812)	99%
PS2-ACC-5.10	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone WRFC90 (JX294740)	99%
CC1-ACC-3.16	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Rahnella</i>	<i>Rahnella</i> sp. JN27 (KC951571)	100%
CC1-ACC-3.3	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i> strain ZJF-G2 (KF367465)	100%
CC1-ACC-3.4	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain CL2 (KF747684)	99%
CC2-PHY-80°C-4.20	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain CL2 (KF747684)	99%
CC2-PHY-4.4	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain CL2 (KF747684)	99%
PS1-PHY-80°C-6.18	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp. KJ-47 (KF598854)	100%
PS2-ACC-5.12	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	<i>Serratia</i> sp. NW-2013-R10 (HG423565)	99%
NP-PHY-2.8	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Leclercia</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i> strain EG88 (KC122711)	100%
AD-PHY-80°C-7.10	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Rahnella</i>	<i>Rahnella aquatilis</i> strain VRT-251 (KF201685)	100%
PT-ACC-10.2	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone WRFC90 (JX294740)	99%
PT-PHY-80°C-11.1	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i> , isolate p412 (AM062693)	100%
PT-PHY- 8.16	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Lelliottia</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HPCAQB14 of halotolerant plant (KF861603)	100%
AD-PHY-80°C-7.21	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HPCAQB14 of halotolerant plant (KF861603)	100%
PT-ACC-10.6	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	<i>Serratia</i> sp. QW45 (KF737382)	95%
PT-PHY-8.9	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp. KJ-47 (KF598854)	99%
PT-PHY-10.3	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Rahnella</i>	<i>Rahnella</i> sp. JN27 (KC951571)	100%
PT-PHY-10.1	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	<i>Serratia</i> sp. NW-2013-R10 (HG423565)	99%

^a Aislado bacteriano

^b La asignación filogenética esta basada en análisis de secuencias reportadas en el RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) o Base de datos GenBank de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

^c Basado en la secuenciación parcial del gen 16s rRNA y su comparación con la base de datos GenBank utilizando MegaBlast.